

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



VARIABILIDADE INDIVIDUAL DO SÉMEN CRIOPRESERVADO EM BODES DE RAÇA
SERPENTINA

INÊS JOÃO COSTA LEITES

ORIENTADOR:
Doutor Carlos Manuel Varela
Bettencourt

COORIENTADOR:
Doutor João Nestor das Chagas e Silva

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



VARIABILIDADE INDIVIDUAL DO SÉMEN CRIOPRESERVADO EM BODES DE RAÇA
SERPENTINA

INÊS JOÃO COSTA LEITES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor Luís Filipe Lopes da Costa

ORIENTADOR:

Doutor Carlos Manuel Varela
Bettencourt

VOGAIS:

Doutora Ana Catarina Belejo Mora
Torres

COORIENTADOR:

Doutor João Nestor das Chagas e Silva

Doutor Carlos Manuel Varela
Bettencourt

Nome: Inês João Costa Leites

Título da Tese ou Variabilidade individual do sémen criopreservado em bodes de raça Serpentina
Dissertação:

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- ☐ Clínica ☐ Produção Animal e Segurança Alimentar
☒ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. ☒ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. ☐ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☐ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 7 de Abril de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura:

Inês Leites

Agradecimentos

O meu primeiro agradecimento pertence aos meus pais. Por me apoiarem e acreditarem em mim, mesmo quando eu própria tenho dúvidas. Obrigada por aturarem noites de estudo que se transformaram em manhãs, por considerarem os meus amigos parte da nossa família e por serem anfitriões de infindáveis sessões de estudo e jantares que transformavam a nossa casa numa estalagem. À minha irmã, por ser uma grande amiga, por saber sempre quando dar o abraço que eu nem queria, mas que claramente precisava. Aos meus avós que estão sempre presentes, prontos para dar aquele conselho sábio e para mostrarem aquele orgulho genuíno que preenche o coração. Ao meu tio por me fazer rir até que a barriga doa, ao Duarte por vir alegrar as nossas vidas e à minha prima Marta que nunca se acanha e que acompanhou as sessões de estudo tardias e prolongadas com os alunos de Veterinária. Aos meus bichinhos, Maggie, Olívia e Jackie, que me acompanharam no estudo desesperado, naquele passeio que eu precisei mais do que eles e pela compreensão silenciosa que vale tudo.

Este foi um percurso cheio de altos e baixos. A constante na minha vida tornou-se nos amigos que via todos os dias e com quem posso contar para rir, chorar, partilhar histórias e momentos e para, sobretudo, me apoiarem quando mais precisar. Um agradecimento enorme à Rita, ao André, à Inês, à Marta, à Catarina Marques por terem alegrado os meus dias e por fazerem parte de tantas memórias felizes! Um agradecimento especial à Mafalda que me aturou desde o dia em que apanhámos um barco para nos inscrevermos na faculdade. Obrigada por estares sempre presente, mesmo quando estamos a quilómetros de distância, por ouvires as minhas histórias mirabolantes, por alinhares nos meus planos tresloucados e por seres uma verdadeira amiga, que tem um lugar muito especial no meu coração.

Um agradecimento ao meu orientador Doutor Carlos Bettencourt, pela sua disponibilidade e boa disposição que animaram o meu estágio. A todo o pessoal que trabalha na Herdade da Abóbada, que sempre me demonstrou carinho e que me fez sentir bem-vinda. Obrigada a todos os que tornaram os meus dias na Herdade, dias muito felizes! Um agradecimento especial ao Dr. Luís Capela por toda a ajuda, pelo muito que aprendi e pela amizade. Obrigada por acreditares que tenho potencial e por me incentivares sempre! À Patrícia por ser uma incrível enfermeira e por ser uma pessoa fantástica que se tornou uma amiga para a vida. Obrigada por toda a ajuda e tardes bem passadas que animaram os meses longe de casa! À tia Zilda, ao tio Manel e ao Fábio por terem a porta da vossa casa sempre aberta e por me receberem como se fosse família. Estão no meu coração!

Um agradecimento à Prof. Doutora Elisa Bettencourt e à Universidade de Évora pela disponibilidade e ajuda. Ao Prof. Doutor Luís Gama por me ter aberto a porta e me ter ajudado

na realização desta tese. Um agradecimento especial à Prof. Doutora Gracinda Rita Guerreiro, da FCT, por me ter ajudado, na qualidade de prima e na qualidade de professora incrível, que mostrou, mais uma vez, trabalhar incansavelmente para ajudar quem precisa.

Por último, um grande agradecimento ao meu coorientador, Doutor Nestor Chagas, que admiro e que, não só me orientou na realização desta dissertação, mas que sempre se mostrou disponível para me ajudar em qualquer situação.

Variabilidade individual do sêmen criopreservado em bodes de raça Serpentina

Resumo

O processo de criopreservação é responsável pela diminuição da qualidade seminal e torna mais clara a existência de uma variabilidade individual na qualidade do sêmen descongelado. O principal objetivo do estudo foi analisar a variabilidade individual na criopreservação de sêmen de bodes de raça Serpentina, no que diz respeito à congelabilidade dos seus ejaculados, através de uma avaliação subjetiva, de testes complementares e de uma avaliação objetiva. Descongelaram-se 40 palhinhas de sêmen criopreservado obtidas a partir de ejaculados de 7 bodes, que foram examinadas por microscopia ótica para a avaliação da motilidade espermática progressiva (%) e foram realizados esfregaços para determinar a vitalidade e a percentagem de anisoespermia. Para avaliar a integridade das membranas plasmáticas dos espermatozoides, as amostras foram submetidas ao teste hipó-osmótico (HOST) e para avaliar o comportamento e resistência dos espermatozoides foram submetidas ao teste de termorresistência (TTR). Por último, foi realizada uma avaliação objetiva da cinética espermática através do sistema CASA. A percentagem de motilidade foi reduzida significativamente ($p < 0,001$) de 80,88% no sêmen fresco para 48,5% após a descongelação. Durante o estudo, os ejaculados foram classificados pelo nível de congelabilidade, de acordo com a sua motilidade pós-descongelação: alto ($>30\%$) e baixo ($\leq 30\%$). Ejaculados com nível de congelabilidade alto apresentaram valores de motilidade ($p < 0,001$), vitalidade ($p < 0,05$) e de motilidade aos 120min do TTR ($p < 0,001$) significativamente superiores aos de baixa congelabilidade. Na avaliação através do sistema CASA foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os ejaculados de congelabilidade alta e baixa nos seguintes parâmetros: MOT ($p < 0,001$), MOTP ($p < 0,001$), VAP ($p < 0,001$), VCL ($p < 0,001$), VSL ($p < 0,05$), ALH ($p < 0,05$), RAPID ($p < 0,001$), MED ($p < 0,001$) e STATIC ($p < 0,001$). Considerou-se, neste estudo, que um bode que produz sêmen de alta qualidade e congelabilidade teria de apresentar uma motilidade pós-descongelação média $>30\%$ e covariância $<0,1$. Assim, apenas os bodes 2121 e 2808 foram considerados indivíduos produtores de sêmen de qualidade superior. Porém, só foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos quanto à vitalidade, aos 5min do TTR e ao BCF. Este estudo demonstrou não existir uma variabilidade individual marcada na qualidade do sêmen criopreservado dos bodes estudados. No entanto, os elevados valores de desvio padrão demonstram que os ejaculados de um mesmo macho são bastantes variáveis nas suas características seminais. A classificação e comparação dos ejaculados pelo seu nível de congelabilidade mostraram ser apropriadas e revelaram diferenças importantes na qualidade do sêmen descongelado de bode.

Palavras-chave: sêmen; bode; Serpentina; CASA; congelabilidade.

Individual variability of cryopreserved semen in *Serpentina* bucks

Abstract

The cryopreservation process is responsible for the reduction of semen quality and makes clearer the existence of individual variability in the quality of thawed semen. The main objective of this study was to analyze the individual variability in the cryopreservation of *Serpentino* buck's semen regarding the freezability of their ejaculates through a subjective evaluation, complementary tests and an objective evaluation. 40 straws of cryopreserved semen, referring to ejaculates of 7 bucks, were thawed and examined through optical microscopy to evaluate the progressive motility of the sperm (%), smears were performed to determine sperm vitality and the percentage of sperm defects. To evaluate the integrity of the sperm's plasma membranes, the samples were subjected to the hypoosmotic test (HOST) and to evaluate the sperm's behavior and resistance the samples were subjected to the thermoresistance test (TTR). Lastly, the objective evaluation of sperm kinetics through a CASA system was performed. Sperm motility was significantly reduced ($p < 0.001$) from 80.88% in fresh semen to 48.5% after thawing. In this study, the ejaculates were classified by their freezability level, according to their post-thaw motility: high ($>30\%$) and low ($\leq 30\%$). Ejaculates with high level of freezability showed motility ($p < 0.001$), vitality ($p < 0.05$) and motility at the TTR 120min ($p < 0.001$) values that were significantly higher than the values of the low freezability ejaculates. The evaluation through the CASA system showed statistically significant differences between the ejaculates with different freezability levels in the following parameters: MOT ($p < 0.001$), MOTP ($p < 0.001$), VAP ($p < 0.001$), VCL ($p < 0.001$), VSL ($p < 0.05$), ALH ($p < 0.05$), RAPID ($p < 0.001$), MED ($p < 0.001$) e STATIC ($p < 0.001$). It was considered, in this study, that a buck that produces high quality and freezability semen must present a mean post-thaw motility $>30\%$ and covariance <0.1 ; therefore, only the bucks 2121 and 2808 were considered individual producers of semen of superior quality. However, the only significant differences found between individual bucks were in regard of vitality, TTR 5min and BCF. This study showed that it does not exist a clear individual variability of the quality of cryopreserved semen of the bucks studied. However, the elevated standard deviation values show that ejaculates of the same individual are quite variable in their seminal characteristics. Therefore, the evaluation and comparison of ejaculates by their freezability level proved to be appropriate and revealed important differences in the quality of post-thaw buck semen.

Keywords: semen; buck; *Serpentina*; CASA; freezability.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	xi
1. Relatório do estágio	1
2. Introdução	2
3. Caracterização sumária da Raça Serpentina	2
4. Particularidades do sémen de bode	4
5. Variabilidade individual da qualidade seminal	5
6. Criopreservação de sémen de caprino	8
6.1. Pontos críticos do manuseamento do sémen	8
6.2. Processamento e congelação de sémen.....	8
6.2.1. Diluidores para a criopreservação de sémen	9
6.2.2. Métodos e protocolos de congelação	11
6.3. Protocolos de descongelação	12
7. Avaliação da dose seminal caprina (pós-descongelação)	12
7.1. Avaliação subjetiva	12
7.1.1. Motilidade.....	13
7.1.2. Morfologia	13
7.1.3. Integridade da membrana plasmática	14
7.2. Testes complementares	14
7.2.1. Teste Hipo-osmótico (HOST)	14
7.2.2. Teste de Termorresistência (TTR).....	15
7.3. Avaliação objetiva	16
8. Causas de redução da viabilidade do sémen criopreservado	18
8.1. Efeitos no metabolismo espermático	19
8.2. Efeitos na ultraestrutura espermática	20
8.3. Efeitos relacionados com a capacitação espermática	22
9. Trabalho experimental.....	24
9.1. Introdução	24
9.2. Material e métodos.....	24
9.2.1. Análise subjetiva	25
9.2.2. Testes complementares	26
9.2.3. Avaliação objetiva da cinética espermática através de um sistema CASA	28
9.2.4. Análise estatística	30
9.3. Resultados e discussão	30

9.3.1.	Análise do sémen em fresco	30
9.3.2.	Análise do sémen descongelado.....	32
9.3.3.	Alteração da viabilidade do sémen criopreservado	45
9.3.4.	Comparação das avaliações subjetiva e objetiva	47
9.3.5.	Variabilidade individual.....	47
10.	Conclusão	48
11.	Referências bibliográficas	51

Lista de Figuras

Figura 1.	Macho de raça Serpentina (retirado de APCRS 2008).	3
Figura 2.	Trajétória do espermatozoide e parâmetros avaliados pelo CASA (adaptado de Kathiravan et al. 2011).	17
Figura 3.	Consequências do arrefecimento do sémen e das taxas de congelação aplicadas (adaptado de Yeste 2016).	19
Figura 4.	Principais consequências dos danos criogénicos no sémen de ruminantes: alterações funcionais, estruturais e moleculares (adaptado de Peris-Frau et al. 2020).....	19
Figura 5.	Danos à membrana plasmática dos espermatozoides durante a criopreservação e a sua relação com o stress oxidativo (adaptado de Peris-Frau et al. 2020).	21
Figura 6.	Esfregaço corado com eosina-nigrosina para avaliar a vitalidade espermática (original da autora)	26
Figura 7.	Espermatozoides durante o teste hipo-osmótico (original da autora).....	27
Figura 8.	Espermatozoides de bode durante o teste hipo-osmótico com diferentes níveis de enrolamento (adaptado de Fonseca et al. 2005).	27

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Definições configuradas no sistema CASA.....	28
Tabela 2.	Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo sistema CASA (adaptado de Partyka et al. 2012; Barbas et al. 2018).....	29
Tabela 4.	Correlações de Pearson (R) entre avaliações seminais (n=40)	35
Tabela 5.	Valores (média \pm desvio padrão) da motilidade pós-descongelação (subjetiva), teste hipo-osmótico (HOST), morfologia espermática e vitalidade dos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)	37
Tabela 6.	Valores percentuais (média \pm desvio padrão) por bode, da motilidade pós-descongelação (subjetiva), HOST, morfologia espermática e vitalidade dos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) e baixo (n=8)	38

Tabela 7. Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da motilidade espermática nas avaliações do teste de termorresistência (TTR) nos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)	40
Tabela 8. Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da motilidade espermática nas avaliações do TTR, por bode (n=7)	40
Tabela 9. Valores médios (média \pm desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo sistema CASA no sémen descongelado com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)....	41
Tabela 10. Valores médios (média \pm desvio padrão) dos parâmetros de velocidade e cinética avaliados pelo CASA, por bode (n=7)	43
Tabela 11. Correlações de Pearson (R) entre as avaliações seminais subjetivas (m.o.) e objetivas (sistema CASA) (n=40).....	46

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Dispersão da motilidade espermática em fresco (após a recolha) dos ejaculados avaliados (n=40).....	31
Gráfico 2. Distribuição da motilidade espermática da população amostral (n=40)	31
Gráfico 3. Distribuição da motilidade espermática dos ejaculados em fresco, por bode (n=7)	32
Gráfico 4. Dispersão da motilidade espermática pós-descongelação dos ejaculados avaliados (n=40).....	33
Gráfico 5. Distribuição da motilidade espermática pós-descongelação na população amostral (n=40)	33
Gráfico 6. Distribuição da motilidade espermática pós-descongelação dos ejaculados criopreservado, por bode (n=7)	34
Gráfico 7. Constituição da população espermática (%) de acordo com a velocidade dos espermatozoides dos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8) .	44

Lista de Abreviaturas

CEBA – Centro de Experimentação do Baixo Alentejo

CRAHA – Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada

BPGA – Banco Português de Germoplasma Animal

VA – Vagina artificial

IA – Inseminação Artificial

CASA – Sistema Computorizado de Análise de Sémen

LG – Livro Genealógico

Spz - Espermatozoides

ECGO – Enzima Coaguladora da Gema de Ovo

m.o. – Microscopia ótica

ZP – Zona Pelúcida

HOST – Teste Hipo-osmótico

TTR – Teste de Termorresistência

VAP – Velocidade média da trajetória

VSL – Velocidade linear progressiva

VCL – Velocidade curvilínea

ATP – Trifosfato de adenosina

AMP – Monofosfato de adenosina

ADP – Difosfato de adenosina

ROS – Espécies reativas de oxigénio

GOT – Transaminase glutâmico-oxaloacética

GPT – Transaminase glutâmico-pirúvica

FIV – Fertilização *In Vitro*

mOsm/L – Miliosmol por litro

µm/s – Micrómetros por segundo

ALH – Amplitude do deslocamento lateral da cabeça

BCF – Frequência do batimento flagelar cruzado

STR – Retilinearidade

LIN – Linearidade

WOB – Índice de oscilação

MOT – Motilidade total

MOTP – Motilidade progressiva

RAPID – Rápidos

MED – Médios

SLOW – Lentos

STATIC – Estáticos

Spz/mL – Espermatozoides por mililitro

1. Relatório do estágio

O estágio curricular decorreu entre 16 de setembro de 2019 e 7 de fevereiro de 2020, no Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), localizado na Herdade da Abóbada, em Vila Nova de São Bento, Serpa. O CEBA desenvolve ações de caracterização, conservação e utilização sustentável de recursos genéticos de raças autóctones. Durante este período, estavam presentes, no CEBA, caprinos das raças Serpentina, Algarvia, Serrana e Preta de Montesinho; ovinos das raças Merina Branca, Merina Preta, Churra Galega Bragançana Branca e Churra Galega Bragançana Preta; bovinos das raças Mertolenga e Garonesa; e, suínos de raça Alentejana.

No CEBA foi possível acompanhar atividades, na área clínica, como exames físicos de diagnóstico, administração farmacológica e acompanhamento na resolução de casos clínicos como pneumonias, timpanismo, mamite e claudicação. No âmbito da sanidade animal foram realizadas intervenções profiláticas como vacinação e desparasitação de ovinos e caprinos e, no âmbito de manejo animal, foram realizadas intervenções de descorna, corte corretivo das úngulas, bem como pesagem e identificação de animais. Na área de reprodução foram realizados exames andrológicos e diagnósticos de gestação em ovinos, caprinos (exame ecográfico) e bovinos (palpação retal); e orquiectomias em suínos.

Inserido no CEBA encontra-se o Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA), licenciado como Centro de Colheita e Armazenagem de Sémen e que funciona como pólo do Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA), Centro de Recolha e Processamento de Sémen de pequenos ruminantes, recolha de embriões de pequenos ruminantes, armazenamento de material genético e Centro de Quarentena, onde os animais têm de permanecer, no mínimo 28 dias, antes de entrarem no centro de colheita.

Durante o estágio no CRAHA foram realizados exames andrológicos, recolhas de sémen através de vagina artificial (VA) ou de eletroejaculação, avaliação e processamento de sémen destinado a refrigeração ou criopreservação, inseminação artificial (IA) cervical e ecografia reprodutiva em ovinos e caprinos.

O presente estudo foi elaborado durante o estágio e as amostras de sémen analisadas são referentes a doses seminais cujos lotes estão armazenados no CRAHA.

2. Introdução

A criopreservação do sémen permite o armazenamento de doses seminais de animais de alto valor zootécnico por tempo indeterminado, maximizando o potencial reprodutivo de um macho (Castelo et al. 2008). Sendo assim, é uma importante ferramenta na conservação de recursos genéticos para a preservação da biodiversidade de espécies ou raças em vias de extinção (Bailey et al. 2003).

Portugal possui grande diversidade no que diz respeito a recursos genéticos, porém grande parte das raças autóctones estão, atualmente, em risco de extinção e há a necessidade crescente de assegurar a sua conservação a longo prazo. A criação de bancos de germoplasma ou de sémen é especialmente importante para as raças autóctones portuguesas, uma vez que, pela redução cada vez mais acentuada dos efetivos, correm risco de extinção no futuro, da qual é exemplo a raça Serpentina, originária de Serpa, com a maioria dos efetivos localizados no Alentejo, zona centro e Algarve (APCRS 2008).

Apesar dos avanços tecnológicos na inseminação artificial, a criopreservação do sémen ainda é um processo complexo que depende de vários fatores para a obtenção de resultados satisfatórios. Um desses fatores é a variabilidade individual associada à capacidade de superar os processos de preservação, designado vulgarmente como congelabilidade, que pode estar relacionada com a suscetibilidade do material genético aos danos induzidos pela criopreservação (Gillan et al. 2004). Sendo esta uma característica importante a ter em conta na criação de programas de melhoramento genético e de bancos de germoplasma/sémen, torna-se pertinente e proveitoso selecionar animais cujo sémen demonstre uma boa congelabilidade, de forma a determinar, para uma raça específica, qual a proporção de animais que apresentam sémen criopreservado de boa qualidade e, por isso, menos suscetível aos danos criogénicos.

No presente trabalho, pretendeu-se estudar a variabilidade entre indivíduos no que diz respeito à congelabilidade do sémen de bodes de raça Serpentina, avaliando a qualidade seminal através de métodos objetivos, como o sistema computadorizado de análise de sémen (CASA), com informação mais precisa e significativa do movimento individual de cada célula, e de testes complementares de avaliação seminal.

3. Caracterização sumária da Raça Serpentina

A raça Serpentina é uma raça autóctone, com origem no Alentejo, sendo essa a região onde se encontrava a maioria do efetivo inscrito no Livro Genealógico (LG) (APCRS 2008).

Um estudo de Bruno de Sousa (2006) demonstra a reduzida diferenciação genética nas raças caprinas ibéricas, o que pode ser explicado pelas migrações e transumância realizadas pelos povos ibéricos ao longo dos tempos e que resultaram na miscigenação entre as populações caprinas da península (APCRS 2008). Julga-se ainda que a raça Serpentina

se tenha formado através cruzamentos de diversos animais trazidos para a Península Ibérica por povos de várias origens, tendo-se fixado no Alentejo, onde, depois de alguma seleção morfológica, surgiu uma população de homogeneidade acentuada, merecendo posteriormente o estatuto de raça (Fialho 1995).



Figura 1. Macho de raça Serpentina (retirado de APCRS 2008).

Não sendo fácil identificar a região onde os primeiros rebanhos Serpentininos se terão formado, existem relatos de várias localizações, porém acabou por se atribuir à região de Serpa o solar da raça, e é dessa região que vem a atual designação de Serpentina. Posteriormente, estes animais irradiaram para o resto do Alentejo e para algumas regiões limítrofes (APCRS 2008).

Para a preservação da raça Serpentina foi fundamental a criação da Associação Portuguesa de Caprinicultores da Raça Serpentina (APCRS 2008), em 1991. Porém, desde o ano 2000, tem-se verificado a tendência para a estagnação do efetivo reprodutor desta raça registado no LG, devido à sua substituição por animais de raças mais produtivas (Fonseca et al. 2018). Assim, nos últimos anos e com o objetivo de promover a seleção e a conservação das raças autóctones, as Associações de Criadores desenvolveram planos para que os seus sócios se envolvessem em ações de inscrição no LG, inseminação artificial e transferência de embriões, caracterização genética e conservação de *ex-situ* através do BPGA, entre outras (Carolino et al. 2016).

Em geral, a raça Serpentina é caracterizada pela rusticidade, demonstrada pela sua resistência, adaptabilidade e dupla aptidão produtiva (carne e leite). São animais robustos e musculares, de perfil reto e normalmente de grande estatura. Têm pelagem branca ou creme,

com um listão preto que, por vezes, se alarga desde a região sagrada até à cauda. O ventre, a parte interna das orelhas, a face, o focinho e a extremidade dos membros também apresentam cor preta. Normalmente, com barba em ambos os sexos, embora mais reduzida nas fêmeas. Podem ser mochos ou apresentar cornos, largos junto à base, dirigidos para cima e para trás e espiralados (APCRS 2008).

Embora não seja uma raça com sazonalidade muito acentuada, a época de cobrição tem início, normalmente, no princípio de maio, com a introdução dos bodes nos rebanhos, até ao final de setembro, altura em que se iniciam as parições e se separam os machos das fêmeas (APCRS 2008).

4. Particularidades do sémen de bode

O sémen é uma suspensão celular que consiste em espermatozoides (spz) provenientes dos túbulos seminíferos e secreções das glândulas acessórias (glândulas vesiculares, próstata e glândulas bulbouretrais) do trato reprodutor masculino (Vicent et al. 2012). A composição do sémen varia consoante espécies (Evans and Maxwell 1987).

Os espermatozoides são células altamente especializadas capazes de fertilização que se desenvolveram a partir de células somáticas (Lemma 2011). O gâmeta masculino é constituído por uma cabeça, onde se encontra o núcleo e cuja porção anterior está protegida pelo acrossoma que alberga enzimas necessárias ao processo de fertilização e, por uma cauda, o órgão locomotor, que permite a propulsão da célula sexual (Evans and Maxwell 1987).

A motilidade progressiva e retilínea é essencial, uma vez que espermatozoides com perturbações da mesma são expulsos, com maior ou menor rapidez, do trato genital feminino (García-Vazquez et al. 2016). Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil, para além da motilidade, é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais (Arruda et al. 2011), para além de outras características como o estado do material genético, nomeadamente a estabilidade da cromatina (García-Vazquez et al. 2016).

O ejaculado do bode, à semelhança do de outros mamíferos domésticos, é heterogéneo no sentido em que nenhum espermatozoide é igual a outro, quer em termos da sua informação genética haploide, quer quanto aos seus atributos para a fertilização (Rodriguez-Martinez and Barth 2007). A presença de espermatozoides em diferentes estádios de maturidade garante a fertilização do oócito, logo após a ovulação (Medeiros et al. 2002). Eles adquirem capacidade fertilizante durante a sua passagem pelo epidídimo e, subsequentemente, na progressão pelo trato genital feminino (Curry 2000). A capacitação é uma associação de eventos bioquímicos que dependem das condições intrínsecas dos espermatozoides e da sua interação com o trato genital feminino, levando a alterações que

lhes permitem sofrer reação acrossômica induzida e, a penetração no oócito (Medeiros et al. 2002).

O plasma seminal atua como um meio de transporte para os gametas masculinos, para além de lhes fornecer nutrientes e um ambiente tampão (Evans and Maxwell 1987), sendo essencial para a sobrevivência dos mesmos no trato genital feminino (Reece 2009). O plasma seminal de bode contém uma variedade de substâncias orgânicas incluindo vários eletrólitos, frutose, ácido cítrico e sorbitol (Frandsen et al. 2009), que mantêm a pressão osmótica do sêmen (Evans and Maxwell 1987). É um fluido isotônico e neutro, cujo pH se mantém perto de 7,0, através de um complexo sistema tampão, o que protege os espermatozoides de qualquer mudança abrupta do pH, que pode ser prejudicial (Evans and Maxwell 1987).

Os espermatozoides têm baixa atividade biossintética e dependem bastante da sua função catabólica para sobreviverem (Barbas and Mascarenhas 2009). Como outras células, eles requerem um fornecimento contínuo de energia e, para isso, metabolizam nutrientes exógenos através de mecanismos como a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (Lemma 2011). A frutose é a principal fonte de energia para os espermatozoides no sêmen de bode (Evans and Maxwell 1987) e a sua principal vantagem é não requerer energia metabólica para entrar na célula espermática (Reece 2009).

As proteínas do plasma seminal atuam como proteínas adsorvidas à membrana plasmática, modulando vários passos essenciais da fertilização, regulando a capacitação, o estabelecimento do reservatório de sêmen no oviduto, a modulação da resposta imunitária uterina, o transporte dos espermatozoides pelo trato genital feminino e a interação entre gametas e a sua fusão (Rodriguez-Martinez 2019). As principais proteínas no plasma seminal dos bodes pertencem ao grupo de proteínas com módulos de fibronectina tipo II (Rodriguez-Martinez 2013). No caso particular desta espécie, a secreção da glândula bulbouretral possui uma enzima coaguladora da gema de ovo (ECGO), uma fosfolipase A, que atua como catalisadora e promove a hidrólise da lecitina da gema de ovo em ácidos gordos e lisolecitina, que promove a atividade fusogénica na membrana dos espermatozoides, induzindo a reação acrossômica e a descondensação da cromatina (Castelo et al. 2008). Outra fração glicoproteica do plasma seminal do bode, é constituída pela enzima SBUIII, igualmente com origem nas glândulas bulbouretrais, e que interage com o leite (Gibbons 2002), provocando uma inibição da motilidade, rutura do acrossoma e morte espermática (Castelo et al. 2008).

5. Variabilidade individual da qualidade seminal

As variações individuais entre bodes são observadas no volume, concentração, vitalidade, morfologia e defeitos espermáticos, dos seus ejaculados (Barbas et al. 2006). Para além dessas, observam-se variações individuais na capacidade de os espermatozoides superarem os processos de criopreservação, designada por congelabilidade (Gillan et al.

2004). Embora a criopreservação tenha sido aplicada na espécie caprina com sucesso, existe uma enorme variabilidade individual na qualidade do sémen criopreservado (Thurston et al. 2001), havendo registo de reprodutores cujo sémen, consistentemente, não sobrevive aos processos de congelação e descongelação e outros que, em oposição, revelam excelentes resultados (Holt 2000).

Através de tecnologias atuais para o estudo das características e funções de espermatozoides individuais, tornou-se evidente que existe uma heterogeneidade considerável (Thurston et al. 2001), não só entre indivíduos, mas entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Thurston et al. 2002). Têm sido identificadas subpopulações, em ejaculados de mamíferos, com base nas características morfológicas e nos padrões específicos de movimento dos espermatozoides individuais (Dorado, Molina et al. 2010). Os ejaculados de bode são heterogéneos e a proporção de espermatozoides em cada subpopulação varia entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo indivíduo (Thurston et al. 1999; Dorado, Molina et al. 2010; Partyka et al. 2012); apresentando igualmente, uma variação significativa ao longo do processo de criopreservação (Partyka et al. 2012; Barbas et al. 2018). Existe ainda, uma forte relação entre as proporções das diferentes subpopulações e a qualidade do sémen, a fertilidade e a capacidade de resistir à criopreservação (Dorado, Molina et al. 2010).

Embora a variabilidade da congelabilidade entre machos seja consensual, as bases moleculares e celulares que a justificam, não o são (Medrano et al. 2010). Uma vez que a variabilidade da permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides entre espécies está descrita, sendo apoiada pelas diferenças na resistência celular ao glicerol, as diferenças na crio-sensibilidade entre indivíduos da mesma espécie podem ser atribuídas à inconsistente sensibilidade da membrana plasmática aos fluxos osmóticos relacionados com a adição e remoção do crioprotetor (Thurston et al. 2002). No entanto, outros autores afirmam que as diferenças de congelabilidade entre espécies e indivíduos não podem ser unicamente atribuídas à permeabilidade da membrana, mas a todos os aspetos da estrutura e função membranares, reações metabólicas, interações entre a membrana e as proteínas do citoesqueleto (Holt 2000) e, ainda, à localização destas no citoesqueleto da célula (Thurston et al. 2002). A suscetibilidade dos espermatozoides de diferentes indivíduos e raças aos danos criogénicos pode, ainda, estar relacionada com a variabilidade na expressão de proteínas de choque térmico, que influencia o sucesso da criopreservação (Thurston et al. 2002).

Considerando a mesma espécie e até a mesma raça, a identificação de indivíduos cujo sémen responde melhor aos protocolos de criopreservação permite argumentar que a variabilidade da congelabilidade do sémen tem, em algum grau, determinação genética (Holt 2000, Thurston et al. 2002). Tem sido sugerido que a variação na qualidade do sémen descongelado é uma resposta a protocolos de criopreservação subótimos (Thurston et al.

2001), apesar de parecer que a taxa de danos criogénicos não pode ser, unicamente, resultado das condições de criopreservação aplicadas, mas também à variabilidade genética individual (Dorado, Muñoz-Serrano et al. 2010). Numa dada população, as diferenças na morfologia espermática podem ter origem durante a espermatogénese, através da transcrição de genes durante a fase pré-meiótica, quando um efeito genotípico heterogéneo contribui para o eventual fenótipo espermático (Thurston et al. 2002). É possível que as diferenças genéticas entre indivíduos influenciem características da membrana plasmática, refletindo-se na tolerância variável aos efeitos da congelação e, posterior descongelação (Thurston et al. 2001). No entanto, é pouco provável que as características das membranas plasmáticas difiram substancialmente entre indivíduos da mesma espécie, ainda que possam mostrar heterogeneidade dentro da mesma população (Thurston et al. 2001).

O efeito prejudicial da criopreservação reflete-se na alteração significativa da distribuição das subpopulações cinéticas de espermatozoides no sémen de bode (Barbas et al. 2018). A classificação de um ejaculado em 'adequado' e 'não adequado', baseada nos parâmetros espermáticos (volume, motilidade, concentração e morfologia), antes e depois da criopreservação, é um bom indicador da congelabilidade do sémen caprino (Dorado, Muñoz-Serrano et al. 2010). Existe uma forte relação entre certas variáveis de motilidade, formas anormais e integridade do acrossoma, e a congelabilidade do sémen, o que sugere serem parâmetros úteis para a previsão do comportamento do sémen fresco durante a criopreservação (Dorado et al. 2009). Em amostras de sémen com maior qualidade, os danos criogénicos são menores e, conseqüentemente, os efeitos da criopreservação na qualidade seminal também o são, indicando melhor congelabilidade (Dorado, Muñoz-Serrano et al. 2010). No sémen fresco, a subpopulação de espermatozoides com movimentos rápidos e lineares representa o grupo com melhor qualidade espermática e a que demonstra velocidade mais elevada, após a descongelação (Barbas et al. 2018). Sundararaman and Edwin (2008) afirmam ainda que, na criopreservação do sémen caprino, a qualidade da motilidade espermática, nomeadamente a velocidade, é mais importante do que a determinação de espermatozoides exclusivamente móveis para a previsão da sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelação. No entanto, subpopulações heterogéneas de espermatozoides coexistem, quer em sémen fresco, quer congelado, o que pode confirmar a hipótese de que pequenos ajustes nos protocolos de criopreservação podem melhorar substancialmente a sobrevivência dos espermatozoides ao processo (Barbas et al. 2018).

É possível que outros fatores sejam responsáveis pela variabilidade da qualidade e congelabilidade do sémen de caprino. A idade pode ser um desses fatores, sendo que animais mais jovens produzem ejaculados de maior volume, concentração espermática e menor percentagem de defeitos (Santos et al. 2006). São também conhecidas diferenças individuais quanto à raça, existindo algumas que produzem consistentemente sémen de qualidade

superior pós-congelação (Thurston et al. 2001). Bodes de raças diferentes podem apresentar diferenças no vigor e motilidade espermáticos, em fresco, o que pode estar relacionado com uma maior sensibilidade à sazonalidade, fotoperíodo ou outros fatores (Santos et al. 2006). No caso dos caprinos, a sazonalidade é particularmente importante. No entanto, não é consensual que a qualidade e a congelabilidade do sémen sejam ou não, afetadas pela época do ano (Barbas et al. 2006, Santos et al. 2006, Dorado, Muñoz-Serrano et al. 2010).

6. Criopreservação de sémen de caprino

6.1. Pontos críticos do manuseamento do sémen

O primeiro passo para a criopreservação reside na colheita do sémen que, nos pequenos ruminantes, pode ser realizada através de vagina artificial ou por eletroejaculação (Jiménez-Rabadán et al. 2016). Nesta fase e independentemente do método utilizado, o risco de contaminação por bactérias ou impurezas é elevado (Souza et al. 2006). A eletroejaculação pode alterar a função secretória das glândulas bulbouretrais, aumentando a concentração de ECGO e modificando a composição do plasma seminal (Jiménez-Rabadán et al. 2016), para além de, aumentar o risco da contaminação da amostra com urina (Evans and Maxwell 1987). Devem ser evitadas flutuações de temperatura durante e depois da colheita (WHO 2010), mantendo todos os equipamentos que entram em contacto com os espermatozoides a uma temperatura próxima da corporal (37,5°C) (Evans and Maxwell 1987). A colheita e o acondicionamento do sémen devem ser feitos em recipientes apropriados para o efeito (vidro ou materiais sintéticos inertes) (Evans and Maxwell 1987), esterilizados e secos (WHO 2010). Nos casos em que a manutenção da temperatura do sémen é feita em banho-maria é importante impedir o contacto da água com o sémen, uma vez que esta é um potente espermicida (Evans and Maxwell 1987). Outros fatores que podem influenciar a sobrevivência dos espermatozoides são a exposição à luz, contaminação por metais e/ou desinfetantes, longas exposições ao ar ou contacto com diluidores com pressão osmótica e capacidade tampão inapropriadas (Evans and Maxwell 1987).

6.2. Processamento e congelação de sémen

Quando o sémen é congelado e mantido a temperaturas muito baixas, as reações metabólicas são quase completamente interrompidas, o que torna possível preservar o sémen durante longos períodos de tempo, conservando-se os genes de machos seleccionados e tornando mais simples o seu transporte (Evans and Maxwell 1987). No entanto, o processo de criopreservação resulta numa sequência de eventos, tais como, a diluição, o arrefecimento, a congelação e a descongelação, que podem ser deletérios para os espermatozoides (Lima et al. 2010).

Existem dois métodos para congelar sémen: a congelação lenta e a rápida (Barbas and Mascarenhas 2009). Um ritmo de congelação mais rápido tem efeitos adversos na congelabilidade de sémen de bode (Purdy 2006). O sémen pode ser armazenado e congelado em palhinhas ou *pellets* (Leboeuf et al. 2000). A escolha do método de congelação deve ter em consideração fatores como a facilidade de manipulação, a mão-de-obra, a técnica de inseminação e a gestão do armazenamento das doses seminais (Purdy 2006). Embora, os *pellets* tenham a vantagem de permitir uma rápida descida da temperatura, são de difícil identificação individual e, para além disso, apresentam um risco maior de contaminação cruzada do sémen (Lemma 2011). As palhinhas são muito utilizadas comercialmente pela alta segurança que conferem e pela fácil identificação das mesmas (Gibbons 2002).

Independentemente do método de congelação, o sémen deve ser processado com um diluidor contendo agentes crioprotetores. O sémen de bode pode ser diluído por um método de diluição de um só passo, por via da adição única do diluidor a 30°C, ou através de um método de dois passos, em que o sémen é diluído, inicialmente, a 30°C, com uma fração do diluidor isenta de glicerol, arrefecido até aos 5°C e então, acrescentando-se a segunda fração contendo glicerol (Evans and Maxwell 1987). No entanto, alguns investigadores não concordam que haja diferença entre a adição de glicerol a 30°C ou a 5°C (Salamon and Maxwell 2000). Depois de diluído a 30°C, o sémen é arrefecido até aos 4-5°C durante 1,5 e 3 horas (Barbas and Mascarenhas 2009). O arrefecimento lento do sémen diluído é o período de tempo para a adaptação dos espermatozoides a um metabolismo reduzido e, também, para que seja atingido o equilíbrio entre as concentrações intra e extracelulares de glicerol e dos outros componentes do diluidor, ainda antes da congelação (Salamon and Maxwell 1995a).

6.2.1. Diluidores para a criopreservação de sémen

Um diluidor seminal de qualidade tem de fornecer aos espermatozoides fontes energéticas, proteger as células de danos bioquímicos e físicos e manter um ambiente propício à sobrevivência dos espermatozoides durante a criopreservação (Gangwar et al. 2016), sem apresentar toxicidade para as células espermáticas (Purdy 2006). Para tal, além de aumentar o volume do ejaculado e, consequentemente, o número de doses seminais, o diluidor deve proporcionar um efeito tampão contra as alterações do pH, manter a pressão osmótica semelhante à do plasma seminal (Castelo et al. 2008) e controlar o desenvolvimento bacteriano.

Os diluidores para a criopreservação do sémen devem ter, na sua constituição, agentes crioprotetores (Gibbons 2002), para minimizar o stress químico e físico associados ao processo (Purdy 2006). Apesar de existirem outros (dimetilsulfóxido, etilenoglicol ou

propilenoglicol), o glicerol é o mais utilizado na maioria das espécies (Lemma 2011). Este tem ação intra e extracelular, diminuindo quer a pressão osmótica associada à desidratação celular, quer o ponto de congelação (Medeiros et al. 2002). No entanto, o glicerol pode ser tóxico para os espermatozoides (Castelo et al. 2008) e a sua concentração ótima está relacionada com as taxas de arrefecimento e congelação escolhidas (Salamon and Maxwell 1995a): taxas mais lentas requerem uma concentração menor de crioprotetores (Barbas and Mascarenhas 2009). Outro agente muito utilizado é a gema de ovo que atua como crioprotetor externo (Gibbons 2002), devido à presença da lipoproteína fosfatidilcolina que confere proteção à membrana celular (Castelo et al. 2008). No caso específico do bode, tendo em conta as particularidades enzimáticas do seu sémen, a gema de ovo pode ser substituída por lecitina de soja (Chelucci et al. 2015). A osmolaridade dos diluidores pode variar. Porém, os espermatozoides de bode preferem um meio hipertónico entre 425 e 525 mOsm (Purdy 2006), o que se pode conseguir por adição de tampões, sais e açúcares (Gangwar et al. 2016). A maioria dos investigadores usa glucose e frutose como fonte energética, enquanto a sacarose e a lactose, que atuam extracelularmente, são utilizadas para manter a pressão osmótica e proteger as membranas plasmáticas (Salamon and Maxwell 2000). O consumo de oxigénio pelos espermatozoides caprinos, assim como a sua motilidade, são máximos a um pH de 7,2 (Gangwar et al. 2016), sendo importante a adição de agentes tampão, como o citrato e o TRIS(hidroximetil)aminometano, para impedir flutuações prejudiciais do pH (Gibbons 2002). Por último, o diluidor deve conter antibióticos a fim de reduzir a carga bacteriana do sémen (Castelo et al. 2008). Nos diluidores de sémen de bode, a associação mais comum é a penicilina com a estreptomicina (Souza et al. 2006).

Originalmente, o sémen era diluído para proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação (Salamon and Maxwell 1995a). No entanto, de modo a rentabilizar o ejaculado e a atingir uma taxa de fertilidade elevada com um mínimo de inseminações e com um número mínimo de espermatozoides por inseminação, o sémen tem de ser diluído corretamente para que a população espermática por dose seminal seja suficiente para se obter uma fertilidade aceitável, o que depende de vários fatores como o tipo de inseminação artificial, local de deposição do sémen no trato genital feminino, altura do ano (sazonalidade) e as características fisiológicas e reprodutivas das fêmeas (Gangwar et al. 2016). Historicamente, o sémen de animais de produção tem sido diluído num volume específico ou numa determinada concentração (Purdy 2006). Sendo que, uma criopreservação bem-sucedida de sémen com fertilidade razoável, é obtida com amostras com uma concentração entre os 80 e os 500×10^6 espermatozoides/mL (Gangwar et al. 2016). A taxa de diluição do sémen caprino pode variar entre 1:1 e 1:23 (sémen:diluidor) (Purdy 2006). No entanto, as taxas de diluição utilizadas atualmente são na ordem dos 1:2 a 1:6 (v/v) (Salamon and Maxwell 2000). Quando o sémen é diluído para obter doses com uma

concentração específica, geralmente 200 milhões de espermatozoides por dose, o volume de diluidor a adicionar é calculado com base no volume e concentração do ejaculado e no volume e concentração espermática da dose seminal (Gibbons 2002).

O sémen de caprino pode ser criopreservado com um diluidor composto por uma grande variedade de componentes (Gangwar et al. 2016). Porém, esta espécie apresenta particularidades seminais que limitam o uso de diluidores ricos em fosfolípidos, como os à base de leite e de gema de ovo (Bezerra 2010). No entanto, esses continuam a ser bastante comuns (Purdy 2006), ainda que o leite deva ser magro e ultrapasteurizado e a concentração de gema de ovo seja inferior à usada noutras espécies (Evans and Maxwell 1987). Têm surgido diluidores comerciais, como o Bioxcell® (IMV Technologies, França) e o Andromed® (Minitube, Alemanha), isentos de proteína de origem animal (Salmani et al. 2013). Estudos comparativos demonstraram que diluidores à base de TRIS suplementados com lecitina forneciam melhor proteção aos espermatozoides de bode do que os suplementados com gema de ovo (Chelucci et al. 2015). Outra substância vegetal estudada é a água de coco (*Cocos nucifera*), cujos efeitos protetores da viabilidade dos espermatozoides demonstraram que é adequada para diluir sémen de caprino (Daramola et al. 2016), uma vez que se trata de uma substância estéril, contendo proteínas, açúcares, vitaminas, minerais, gorduras neutras e fatores de crescimento, para além de indutores de divisão celular e vários eletrólitos necessários à sobrevivência dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (Castelo et al. 2008).

6.2.2. Métodos e protocolos de congelação

O sémen diluído é arrefecido até aos 4-5°C e depois, congelado, acondicionado em palhinhas francesas (mini ou médias) ou na forma de grânulos ou *pellets* (Leboeuf et al. 2000). No caso da congelação do sémen em palhinhas, as amostras são congeladas (terminado o tempo de equilíbrio a 4°C), ao entrarem em contacto com os vapores frios de azoto líquido durante 20 minutos, sendo de seguida mergulhadas e armazenadas em azoto líquido, a -196°C (Castelo et al. 2008). Em vez de uma descida linear da temperatura do sémen, o ideal é arrefecer o sémen segundo uma curva parabólica, o que se consegue através da suspensão das palhinhas entre 4 e 6 cm acima do nível do azoto líquido (Salamon and Maxwell 2000) ou num congelador computadorizado programável (Lemma 2011). Sendo que a velocidade do arrefecimento também é modulada pelo tamanho das palhinhas: minis (0,25 mL) ou médias (0,5 mL) (Leboeuf et al. 2000). O sémen de bode tolera uma variedade de taxas de congelação, sendo a mais adequada 50 a 100°C/minuto, que permite a congelação da água extracelular sem formação de gelo intracelular (Barbas and Mascarenhas 2009).

A congelação do sémen sob a forma de *pellets* é um método rápido e simples que envolve o arrefecimento do sémen em gelo seco ou neve carbónica (dióxido de carbono sólido) a -79°C , a um ritmo determinado pelo volume do *pellet* e, posteriormente, o armazenamento por imersão em azoto líquido a -196°C (Leboeuf et al. 2000).

6.3. Protocolos de descongelação

Para ser utilizado, o sémen criopreservado tem de ser descongelado (Bezerra 2010). Durante esse processo, o sémen congelado passa por uma fase de temperatura crítica entre os -60 e os -15°C , sendo que a taxa de descongelação depende da taxa de congelação, ou seja, se a mesma foi suficientemente rápida para induzir congelação da água intracelular ou lenta o suficiente para causar desidratação celular (Barbas and Mascarenhas 2009). Durante a descongelação rápida (por exemplo, em banho-maria a 37°C , durante 45 segundos), o tempo de recristalização é limitado, o que aumenta a sobrevivência dos espermatozoides (Lemma 2011), para além de permitir restaurar o equilíbrio osmótico intra e extracelular mais rapidamente do que durante uma descongelação lenta (Salamon and Maxwell 1995a). No entanto, podem ser usadas temperaturas de descongelação entre os 4 e os 75°C (Lemma 2011), sendo que com taxas mais rápidas, o tempo é um fator crítico, visto que, se for excedido, a mortalidade espermática aumenta (Bezerra 2010).

Tradicionalmente, o sémen de bode armazenado em palhinhas é descongelado, em banho-maria a 37°C , durante 12 a 30 segundos (Purdy 2006), podendo chegar até aos 2 minutos (Gibbons 2002). O sémen congelado em *pellets* pode ser descongelado numa solução (descongelação húmida) ou tubos secos (descongelação seca) (Salamon and Maxwell 1995a), a 37 ou 75°C (Salamon and Maxwell 2000).

7. Avaliação da dose seminal caprina (pós-descongelação)

7.1. Avaliação subjetiva

Nas espécies animais, a motilidade espermática é considerada a característica mais importante associada ao potencial fértil (Verstegen et al. 2002). Ela constitui um atributo essencial para a deslocação dos espermatozoides no trato genital feminino e para a penetração do oócito e, logicamente, ejaculados com uma maior proporção de espermatozoides móveis terão maior vantagem em termos de fertilidade (Bernardi 2008). Sendo a motilidade uma expressão da viabilidade, da integridade e da morfologia espermáticas, estas características estão diretamente relacionadas com os eventos fisiológicos que ocorrem na fertilização, uma vez que apenas espermatozoides móveis, íntegros e morfologicamente normais podem sofrer capacitação, hiperativação e reação acrossómica no momento mais apropriado (Verstegen et al. 2002).

A avaliação da fertilidade masculina pode ter por base o exame do sémen descongelado usando-se para tal, parâmetros convencionais como a motilidade, a morfologia, a vitalidade, estimativas bioquímicas de libertação de enzimas, a integridade do acrossoma e da membrana plasmática (Kathiravan et al. 2011). Os testes de avaliação da função espermática podem ter maior correlação com a fertilidade do sémen. Porém, providenciam apenas uma estimativa, mesmo quando utilizados num modelo de bateria de testes (Rodriguez-Martinez and Barth 2007). Este tipo de avaliação é subjetivo e os resultados dependem bastante da experiência e da competência do avaliador e apresenta alta variação entre observadores e observações (Arruda et al. 2011, Partyka et al. 2012).

7.1.1. Motilidade

Na análise do sémen, a motilidade mantém-se como o parâmetro mais relevante para determinar o grau de danos espermáticos induzidos pela criopreservação (Kathiravan et al. 2011). O método mais comum de avaliação é por microscopia ótica (m.o.) (Dorado, Muñoz-Serrano et al. 2010), normalmente numa preparação lâmina-lamela, com o material e platina térmica previamente aquecidos a 35°C (WHO 2010). A motilidade espermática é avaliada subjetivamente, estimando-se uma percentagem (Arruda et al. 2011), que expressa a percentagem total de espermatozoides móveis ou progressivamente móveis (Partyka et al. 2012); e, mesmo quando avaliada por técnicas mais sofisticadas, a análise pode não ser fidedigna, caso não se tenha em consideração a heterogeneidade do ejaculado (Bernardi 2008).

7.1.2. Morfologia

Os defeitos morfológicos estão presentes em qualquer ejaculado, mas diferem no seu impacto na fertilidade (Rodriguez-Martinez 2013). A sua classificação faz parte integral da análise rotineira do sémen, uma vez que fornece informação sobre o potencial fértil das amostras de sémen (Matos et al. 2008). Apesar de existirem métodos mais recentes usados na análise do sémen, o esfregaço é o mais comumente utilizado para uma avaliação morfológica de rotina, através de m.o. (Partyka et al. 2012). De forma geral, o espermograma é executado através de esfregaços corados com corantes, tais como Wright, Rosa de Bengala, Giemsa, eosina-nigrosina, Karras e outros; ou através da técnica da câmara húmida (Arruda et al. 2011). Em cada preparação, devem ser contados 100 a 300 espermatozoides, calculando-se depois a percentagem dos diferentes defeitos espermáticos (Partyka et al. 2012).

7.1.3. Integridade da membrana plasmática

O método tradicional de avaliação da integridade da membrana envolve a determinação da percentagem de espermatozoides viáveis através de um teste de exclusão de corante (Partyka et al. 2012). Este método baseia-se no princípio de que membranas plasmáticas danificadas, como as das células mortas, permitem a entrada do corante e a consequente coloração da célula (WHO 2010). Para tal efeito, são utilizadas colorações supra-vitais, como anilina-eosina, eosina-nigrosina ou eosina-verde rápido (*fast green*) (Partyka et al. 2012). A avaliação pode ser feita através de esfregaços corados ou de preparações húmidas (WHO 2010). No entanto, na análise de sémen descongelado, os corantes podem ser negativamente afetados por componentes do diluidor como a gema de ovo e o glicerol, causando aglutinação e perda de diferenciação de estruturas espermáticas (Partyka et al. 2012).

7.2. Testes complementares

Não há evidência de que parâmetros como a motilidade, a morfologia ou a concentração espermáticas, isoladamente, sejam suficientes para se avaliar o potencial fértil de dado ejaculado (Oliveira et al. 2013). A análise combinada de várias características seminais apresenta um potencial preditivo maior (Bernardi 2008). A grande dificuldade reside na inexistência de um teste único para aferir os atributos que os espermatozoides devem possuir para fertilizar o oócito (Arruda et al. 2011).

Atualmente, há mais metodologias para a avaliação da competência funcional dos gametas masculinos, bem como da sua capacidade de interagir com os fluidos circundantes (fluidos genitais femininos, meios de cultura *in vitro*), com as células (epitélio, células do *cummulus*, oócitos) ou com o material extracelular (zona pelúcida), antes da fertilização (Rodriguez-Martinez 2013). Exemplos desses testes incluem a ligação e penetração da zona pelúcida (ZP), a ligação a proteínas solubilizadas da ZP e a fecundação *in vitro* de oócitos (Bernardi 2008). Apesar de simularem com maior exatidão o que acontece *in vivo*, estes testes mantêm-se controversos quanto ao seu valor prognóstico da fertilidade do sémen (Bernardi 2008).

7.2.1. Teste Hipo-osmótico (HOST)

A membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio e a sua atividade bioquímica tem grande influência nos processos de capacitação espermática e na fertilização (Oliveira et al. 2013). Devido a essa importância, o estudo da integridade da membrana plasmática é muito relevante na avaliação do sémen (Ahmad et al. 2014), como sendo um requisito essencial para o metabolismo e função espermáticos (Bernardi 2008).

O teste hipo-osmótico (HOST) é um método de análise da integridade da membrana plasmática em alternativa à coloração supra-vital (Partyka et al. 2012). Nos machos caprinos, essa avaliação é baseada em métodos desenvolvidos noutras espécies domésticas (Fonseca et al. 2005). Este teste baseia-se no princípio da semi-permeabilidade da membrana celular (Ahmad et al. 2014). Assim, perante uma solução hipo-osmótica, há entrada de fluido nos espermatozoides, que aumentam de volume e enrolam ou dobram as caudas (Bernardi 2008). Os espermatozoides com membranas intactas e funcionais são aqueles que revelam essas alterações (WHO 2010), o que torna este teste mais específico do que a avaliação da motilidade que, por sua vez, depende de vários atributos espermáticos como a integridade da membrana, o metabolismo espermático e a ação microtubular das fibras da cauda (Oliveira et al. 2013).

Os espermatozoides de bode apresentam um padrão de hipertrofia semelhante ao de outras espécies domésticas e qualquer diferença na intensidade de enrolamento da cauda pode dever-se a variações individuais da integridade da membrana plasmática (Fonseca et al. 2005). No caso do sémen criopreservado, a percentagem de espermatozoides que sobrevivem a condições hiposmóticas diminui drasticamente, em comparação com o sémen fresco, uma vez que os processos de congelação e descongelação influenciam a integridade daquela membrana (Blässe et al. 2012). Apesar das diferenças entre espécies, o HOST é adequado para testar a membrana dos espermatozoides de bode, para além de ser uma ferramenta valiosa para uma análise mais exata e individual da célula espermática, do que da população como um todo (Fonseca et al. 2005).

7.2.2. Teste de Termorresistência (TTR)

Entre os testes *in vitro*, que visam determinar a qualidade do sémen descongelado, o teste de termorresistência (TTR) foi desenvolvido para a avaliação da longevidade potencial das doses seminais de bovinos e, posteriormente, adaptado às outras espécies (Barros et al. 2013). O TTR avalia a integridade das células espermáticas (Talini et al. 2019), simulando as condições do trato genital feminino, expondo os espermatozoides a temperaturas elevadas durante um período de tempo variável, avaliando-se posteriormente, a motilidade espermática progressiva (Schulze et al. 2019).

Quando a célula espermática recupera a sua função metabólica, depois da descongelação, começa a consumir nutrientes do meio de conservação, resultando na produção de metabolitos. À medida que este processo continua, a quantidade de nutrientes disponíveis para as células é reduzida, diminuindo, conseqüentemente, a produção de energia necessária ao movimento da cauda dos espermatozoides (Talini et al. 2019). Apesar dos espermatozoides serem transportados rapidamente até ao oviduto, são mantidos no trato genital feminino por várias horas até que ocorra a ovulação. Depois desse período, mais ou

menos prolongado, apenas os espermatozoides com um metabolismo normal são móveis e capazes de fertilizar o oócito (Schulze et al. 2019). O TTR representa uma simulação parcial *in vitro*, do processo *in vivo* que o sémen sofreria após a inseminação (Barros et al. 2013).

Existem vários protocolos de TTR: o lento (incubação a 38°C/5h), o fisiológico (36°C/3h) e o rápido (46°C/ 30 min) (Cunha et al. 2012). Segundo estes últimos autores, o TTR fisiológico é o que mais se aproxima das condições reais que os espermatozoides encontram no trato genital feminino. Independentemente do método selecionado, há uma diminuição da motilidade progressiva, decorrente da perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides (Barros et al. 2013).

No caso particular do sémen congelado, o TTR avalia se a motilidade espermática se mantém num nível elevado, por um período de tempo prolongado, mesmo em doses de sémen comerciais sujeitas a um armazenamento de longa duração (Schulze et al. 2013). No entanto, o TTR também é um teste subjetivo e existem muitos fatores que influenciam os seus resultados e a sua interpretação, como o diluidor, o volume e a concentração por dose, o tempo e a temperatura do teste e a incubação da amostra na palhinha ou fora dela (Barros et al. 2013).

7.3. Avaliação objetiva

A necessidade de uma avaliação mais objetiva e rigorosa levou ao desenvolvimento de sistemas computadorizados de análise do sémen, como por exemplo, a análise computadorizada do sémen (CASA). Esta metodologia garante uma avaliação objetiva do ejaculado, quando a principal desvantagem da avaliação tradicional é a variabilidade de resultados (Partyka et al. 2012). A análise computadorizada do sémen fornece uma informação alargada sobre as propriedades cinéticas do ejaculado, com base em medições nos espermatozoides individuais (Lemma 2011). Apesar de, em medicina veterinária, ainda não ser aplicado rotineiramente, nos últimos anos, o seu uso tornou-se mais frequente para estabelecer relações entre os parâmetros de qualidade espermática e a fertilidade e, especialmente, para melhorar as técnicas de reprodução assistida, nomeadamente, para otimizar os protocolos de criopreservação (Verstegen et al. 2002). Em animais de alto valor, como as espécies ou as raças em vias de extinção, a abordagem à infertilidade é mais semelhante à da medicina Humana, sendo a análise computadorizada de grande importância na avaliação daquele problema (Verstegen et al. 2002).

Os vários sistemas CASA são semelhantes entre si, diferindo no *software* e no equipamento ótico usado na identificação dos espermatozoides e na reconstrução das suas trajetórias (Verstegen et al. 2002). Estes equipamentos são capazes de determinar a motilidade, a cinética, a concentração e a morfologia espermáticas (WHO 2010) e, tornam as análises rápidas e os resultados fáceis de interpretar (Matos et al. 2008). A CASA fornece um

vasto leque de parâmetros cinéticos que traduzem o estado fisiológico dos espermatozoides (Kathiravan et al. 2011), como por exemplo a motilidade progressiva e a motilidade hiperativa, sendo esta última, característica de células capacitadas (WHO 2010). Para além disso, este sistema tem a vantagem de classificar diferentes subpopulações de espermatozoides, de acordo com parâmetros cinéticos e morfológicos, possibilitando a oportunidade de estabelecer critérios para diferentes aspetos funcionais relacionados com a fertilidade (Kathiravan et al. 2011). Adicionalmente, algumas máquinas estão equipadas com módulos de excitação UV, para análise de espermatozoides tratados com corantes vitais fluorescentes (Partyka et al. 2012).

O algoritmo usado difere entre os vários sistemas CASA, mas o princípio básico mantém-se: a câmara de vídeo captura imagens microscópicas dos espermatozoides, que são depois digitalizadas pelo computador tendo por base o número de pixéis por cabeça, dos espermatozoides (Kathiravan et al. 2011). Estes sistemas estão preparados para classificar as estruturas e distinguir células espermáticas de detritos e/ou de células sobrepostas (Verstegen et al. 2002). O software reconhece as células e reconstrói, para cada espermatozoide, a sua trajetória e classifica-a quanto ao tipo (linear e não linear) e quanto à velocidade (rápida e lenta) (Matos et al. 2008), reportando vários parâmetros (Figura 2).

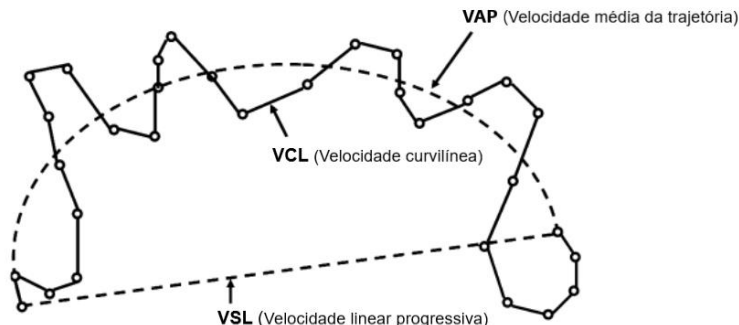


Figura 2. Trajetória do espermatozoide e parâmetros avaliados pelo CASA (adaptado de Kathiravan et al. 2011).

Apesar de ser uma análise objetiva, a avaliação depende da experiência do observador e dos parâmetros selecionados (Verstegen et al. 2002), tendo em conta que existe uma variação de pixéis entre as várias espécies (Kathiravan et al. 2011). Para além disso, é necessário um controlo de qualidade e uma uniformização dos pré-requisitos, e treino dos técnicos de laboratório, para se melhorar a precisão e repetibilidade dos resultados, de modo que a análise através do sistema CASA seja fidedigna e confiável (Verstegen et al. 2002).

A proporção de espermatozoides capacitados, sem reação acrossómica, associada à capacidade de se submeterem ao processo de hiperativação (HA), podem ser indicadores de

um ejaculado com elevado potencial fértil (Verstegen et al. 2002). A classificação destas subpopulações, através de parâmetros cinéticos específicos, obtidos através do CASA (Kathiravan et al. 2011), é particularmente importante na análise do sémen criopreservado, uma vez que a sua menor taxa de fertilidade está relacionada com uma maior taxa de reação acrossómica e com uma menor taxa de espermatozoides capacitados capazes de penetrar o oócito (Verstegen et al. 2002).

8. Causas de redução da viabilidade do sémen criopreservado

O processo de criopreservação consiste numa interrupção artificial da maturação dos espermatozoides pós-ejaculação e, mesmo com técnicas avançadas e melhoradas, causa sempre danos aos gametas masculinos (Lemma 2011). As variações de temperatura relacionadas com a congelação e descongelação da dose seminal resulta, inevitavelmente, na redução da quantidade de espermatozoides viáveis (Salamon and Maxwell 1995b). Geralmente, depois da descongelação, 40 a 60% dos espermatozoides preservam a sua motilidade, porém, apenas 20 a 30% se mantêm biologicamente intactos, pois um espermatozoide pode ser móvel, mas apresentar danos bioquímicos, ultraestruturais e/ou funcionais que o tornam incapaz de fertilizar o oócito (Salamon and Maxwell 2000).

É sabido que o arrefecimento do sémen de ungulados, entre os 30 e os 0°C, induz stress letal para algumas células, proporcional à taxa de congelação e do limite de temperatura aplicados (Castelo et al. 2008). Quando aquela é rápida, formam-se cristais de gelo a partir da água intracelular, que provocam danos ou morte celular. Quando ela é lenta, o meio extracelular congela primeiro, aumentando a concentração de solutos na fração não congelada, e aumentando, conseqüentemente, a pressão osmótica, levando à saída de água intracelular, causando desidratação celular (Bezerra 2010) (Figura 3).

Uma criopreservação bem-sucedida tem como objetivo otimizar a taxa de congelação, possibilitando um compromisso entre todos os fatores envolvidos no processo (Lemma 2011). Maxwell and Watson (1996) afirmam que é possível que o processo de criopreservação selecione os espermatozoides mais viáveis, resultando numa população, pós-descongelação, mais pequena, mas mais fértil. No entanto, o potencial fértil de uma amostra de sémen descongelado é difícil de avaliar, uma vez que uma grande proporção de espermatozoides sofre danos subletais e que, apesar de os mesmos serem móveis e morfologicamente normais, revelam baixa fertilidade (Bailey et al. 2003).

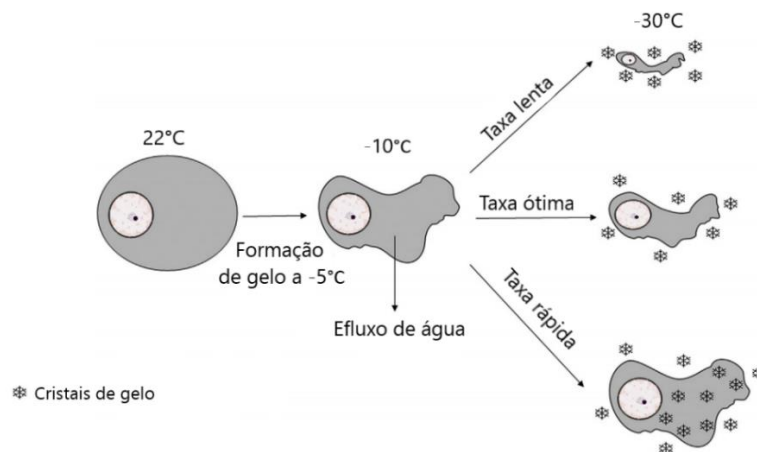


Figura 3. Consequências do arrefecimento do sêmen e das taxas de congelamento aplicadas (adaptado de Yeste 2016).

8.1. Efeitos no metabolismo espermático

A redução gradual da atividade metabólica dos espermatozoides durante o armazenamento, a temperaturas muito baixas, limita a produção de subprodutos tóxicos, enquanto compromete funções espermáticas, como a motilidade espermática (Lemma 2011) (Figura 4).

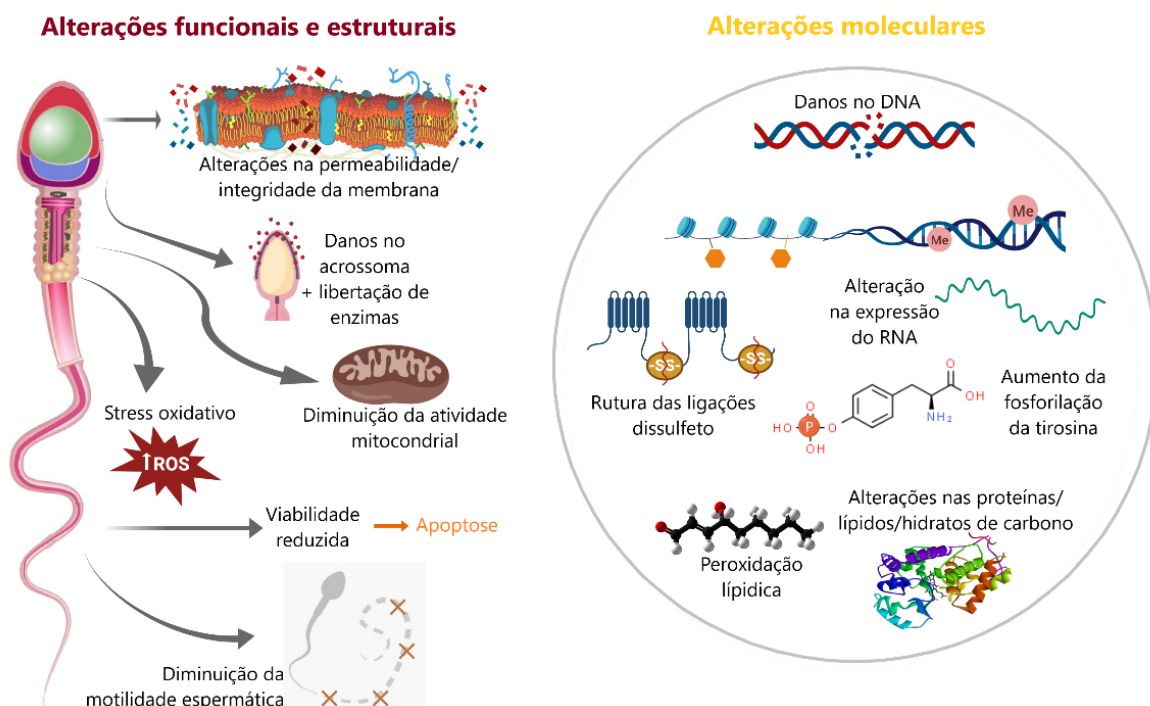


Figura 4. Principais consequências dos danos criogênicos no sêmen de ruminantes: alterações funcionais, estruturais e moleculares (adaptado de Peris-Frau et al. 2020).

Durante a criopreservação, há uma diminuição da motilidade e uma alteração do padrão cinético dos espermatozoides, o que pode estar relacionado com a disrupção da produção energética, por danos mitocondriais e/ou na peça intermédia (Gillan et al. 2004). O trifosfato de adenosina (ATP) gerado por fosforilação oxidativa, na membrana interna da mitocôndria, aciona a motilidade da cauda. Durante a criopreservação, a concentração de ATP é reduzida ou perdida e a taxa de monofosfato de adenosina (AMP)/difosfato de adenosina (ADP) é aumentada (Lemma 2011). Apesar dos filamentos e fibrilhas da cauda não revelarem alterações detetáveis (Salamon and Maxwell 2000), a estrutura íntima da mitocôndria pode sofrer alterações durante a congelação e a descongelação, diminuindo a taxa de respiração mitocondrial e prejudicando a motilidade espermática (Gillan et al. 2004). Para além disso, o cérvix da fêmea tem uma baixa quantidade de açúcares capazes de sofrer glicólise, mas possui quantidades adequadas de ácido láctico e de oxigénio, tornando a respiração oxidativa importante para a produção de energia para a progressão dos espermatozoides nesta região (Gillan et al. 2004). Durante a produção energética, através da fosforilação oxidativa, são geradas grandes quantidades de espécies reativas de oxigénio (ROS), como aniões superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Lemma 2011). A suscetibilidade do sémen de ruminantes ao stress oxidativo é consequência da abundância de ácidos gordos polinsaturados na membrana plasmática, e da presença de ligações duplas nestas moléculas, que as tornam vulneráveis aos radicais livres e à ativação da cascata de peroxidação lipídica, implicando danos oxidativos que prejudicam a função espermática (Chelucci et al. 2015) (Figura 5), nomeadamente a sua motilidade e capacidade fértil, em virtude da destabilização das membranas e envelhecimento celular (Maxwell and Watson 1996).

8.2. Efeitos na ultraestrutura espermática

Os danos ultraestruturais ocorrem nas membranas plasmática e acrossómica, na bainha mitocondrial e no axonema e, são acompanhados por alterações bioquímicas e perda de conteúdo enzimático (Salamon and Maxwell 2000).

O choque térmico provoca desequilíbrios iónicos, como o aumento de iões de cálcio, sódio e zinco e a perda dos de potássio e magnésio (Bezerra 2010), para além de afetar as funções celulares, como a perda de seletividade da membrana plasmática (Medeiros et al. 2002). Quando as membranas são sujeitas a um arrefecimento, os lípidos que as constituem, sofrem uma transição do seu estado fluido para um estado líquido cristalino, em que as cadeias de ácidos gordos se desorganizam (Medeiros et al. 2002). Durante a congelação, esse estado é alterado para um estado de gel, com as cadeias de ácidos gordos a reorganizarem-se numa estrutura rígida (Lemma 2011) (Figura 5). Essa transição de fase dos fosfolípidos membranares resulta na reestruturação dos componentes da membrana e na

reorganização da sua estrutura tridimensional (Medrano et al. 2010). Sendo que os diferentes fosfolípidos que constituem a membrana plasmática sofrem transição de fase a diferentes temperaturas, durante o processo de criopreservação, com a migração lateral desses fosfolípidos e separação da fase lipídica, há uma alteração na organização em bicamada (Medeiros et al. 2002).

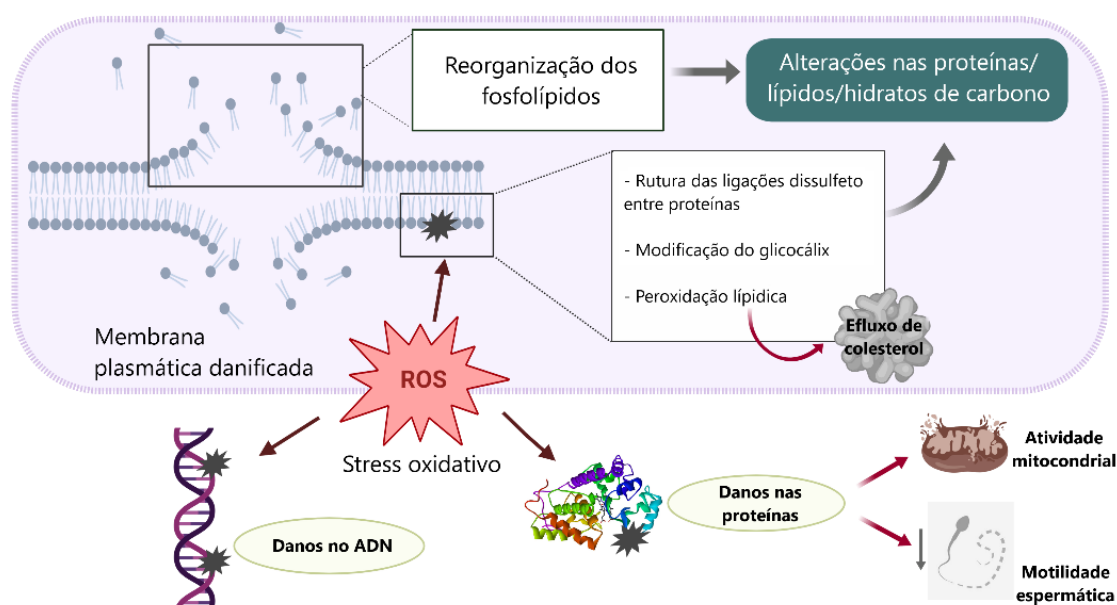


Figura 5. Danos à membrana plasmática dos espermatozoides durante a criopreservação e a sua relação com o stress oxidativo (adaptado de Peris-Frau et al. 2020).

Para além destas alterações levarem à perda de integridade funcional e estrutural da membrana conduzem, igualmente, a alterações nas interações entre lipídios e proteínas (Lemma 2011). Consequentemente, essas interações são interrompidas e as proteínas deixam de atuar como enzimas, recetores e canais iónicos (Medeiros et al. 2002). A desorganização de proteínas na membrana plasmática, como as que pertencem à família de transporte da glucose (GLUT), é uma consequência da criopreservação particularmente importante, uma vez que desempenham funções na regulação do metabolismo espermático daquela e também, da frutose (Lemma 2011). Estas alterações biológicas e funcionais nas células espermáticas, prejudicam a sua capacidade fertilizadora, sendo uma delas a integridade membranária (Chelucci et al. 2015). Esta alteração, em particular, leva ao extravasamento de conteúdo, nomeadamente das enzimas transaminase glutâmico-oxaloacética (GOT) e transaminase glutâmico-pirúvica (GPT), diminuindo a atividade enzimática intracelular (Sharma et al. 2013).

A membrana plasmática e a acrossômica são mais sensíveis ao processo de criopreservação, do que o núcleo e a peça intermédia dos espermatozoides, sendo que a membrana exterior do acrossoma é mais vulnerável que a parte interna e que a membrana interior (Salamon and Maxwell 2000). A alteração da permeabilidade da membrana acrossômica e das mitocôndrias aos íons de cálcio interfere com o potencial fértil dos espermatozoides, facto agravado pela vesiculação das membranas plasmática e acrossômica, que ocorre durante a sua morte e representa uma reação acrossômica falsa (Lemma 2011). Estudos realizados com sémen de caprino descongelado, através do sistema CASA, demonstraram que, o tamanho das cabeças dos espermatozoides diminuiu significativamente, comparativamente a amostras de sémen fresco, o que pode estar relacionado com a presença de um grande número de espermatozoides, com acrossomas danificados ou ausentes, ou com a condensação excessiva da cromatina, resultantes dos processos de congelação e descongelação (Hidalgo et al. 2007). A condensação normal e a estabilização da cromatina no núcleo, seguidas da sua descondensação após a penetração do espermatozoide no oócito, são pré-requisitos para a fertilização (Lemma 2011). O genoma espermático codifica protaminas, cujo conteúdo em cisteína estabelece ligações que resultam na compactação e estabilização do ADN associado. Porém, o processo de criopreservação parece reduzir a capacidade da cromatina espermática de descondensar (Lemma 2011). A qualidade do ADN dos espermatozoides está correlacionada com a fertilidade e, pode estar relacionada com o aumento da mortalidade embrionária, após IA com sémen criopreservado (Gillan et al. 2004). Estas alterações criogénicas nos espermatozoides, são responsáveis pela diminuição da integridade funcional, da sobrevivência *in vivo* e da capacidade fértil, para além de um transporte inadequado, da reduzida viabilidade do sémen no trato genital feminino (Salamon and Maxwell 2000) e de um desenvolvimento embrionário anormal (Gillan et al. 2004).

8.3. Efeitos relacionados com a capacitação espermática

Os espermatozoides ejaculados não possuem capacidade fértil até sofrerem a capacitação. Porém, é possível que o processo de armazenamento de sémen congelado antecipe o processo de maturação das membranas plasmáticas, aumentando a proporção de espermatozoides capacitados e com reação acrossômica, comparativamente ao sémen fresco (Maxwell and Watson 1996). Depois dos gâmetas masculinos contactarem com as células tubáricas, sofrem a capacitação e uma hiperativação, ligam-se à ZP, ativam a reação acrossômica, penetram na zona (um spz por oócito) e, finalmente, invadem o oolema e fundem-se (Lemma 2011). A capacitação envolve eventos de destabilização da membrana, efluxo de colesterol e redistribuição dos seus componentes, sendo essencial que ocorra numa altura e local apropriados, no trato genital feminino (Gillan et al. 2004).

No entanto, há trabalhos que demonstraram que, tanto a incubação como a congelação e a descongelação, provocam nos espermatozoides, mudanças semelhantes à capacitação e que, a incubação de células já capacitadas conduz à reação acrossômica (Maxwell and Watson 1996). Durante a criopreservação, essas células não conseguem moderar os níveis internos de cálcio. As membranas reestruturadas e as associações entre lípidos e proteínas alteradas, favorecem ainda mais esse influxo de íons de cálcio, simulando o que acontece durante a capacitação e a reação acrossômica (Lemma 2011).

O tempo de vida dos espermatozoides hiperativados, livremente móveis, não ligados ao epitélio do oviduto, é relativamente curto, uma vez que essa hiperatividade e o influxo de cálcio no citoplasma afetam negativamente a viabilidade e a vida fértil dos mesmos (Partyka et al. 2012). Estudos em sistemas de FIV demonstraram que os espermatozoides descongelados conseguem penetrar imediatamente os oócitos, o que prova que o seu estado funcional é mais avançado que o dos frescos, e revela que têm um período de tempo mais curto para fertilizar o oócito, *in vivo* (Gillan et al. 2004). Este processo pode ser reversível, mas os espermatozoides maduros podem ser incapazes de fertilizar se sofrerem um envelhecimento adicional no trato reprodutivo após a inseminação (Maxwell and Watson 1996). A precoce maturação dos espermatozoides criopreservados, explica a morte prematura dos mesmos nas regiões caudais do trato genital feminino, após a inseminação, assim como o seu refluxo do trato, com a consequente quebra da fertilidade do sémen criopreservado (Gillan et al. 2004).

O sémen descongelado revela uma alteração de comportamento quando contacta com o epitélio do oviduto: os espermatozoides ligam-se imediatamente a essas células e libertam-se rapidamente (Gillan et al. 2004), o que torna difícil o estabelecimento de um reservatório de espermatozoides no istmo, e que se traduz na redução da sua capacidade fértil e do seu tempo de vida útil no trato genital feminino (Curry 2000). É possível que o envelhecimento dos espermatozoides, já funcionalmente capacitados no trato genital feminino, não impeça a fertilização, mas que a fecundação do oócito por gametas que não sofreram uma capacitação 'normal' leve a um desenvolvimento embrionário anormal (Gillan et al. 2004).

Assim, a criopreservação reduz o tempo de vida *in vivo* e compromete o potencial fértil da amostra de sémen, uma vez que diminui a heterogeneidade da população espermática (Lemma 2011); sendo que uma subpopulação, mais pequena, mantém os movimentos progressivos e lineares pós-descongelação e outras, mais predominantes, têm valores de linearidade e velocidade mais baixos, prejudicando a fertilidade do sémen descongelado (Barbas et al. 2018).

9. Trabalho experimental

9.1. Introdução

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito do estágio curricular realizado no Centro de Reprodução Animal da Herdade da Abóbada (CRAHA), pertencente ao Centro de Experimentação do Baixo Alentejo (CEBA), localizado na Vila Nova de São Bento, no concelho de Serpa. Teve como principal objetivo avaliar a variabilidade individual de bodes de raça Serpentina no que diz respeito à congelabilidade dos seus ejaculados, através de uma análise objetiva e de testes complementares de avaliação do sémen, para além de estabelecer uma comparação do valor da avaliação subjetiva, feita rotineiramente em laboratório, com os valores obtidos por via de uma avaliação objetiva. O recurso a diferentes métodos de avaliação e a testes específicos que avaliem aspetos estruturais e funcionais dos espermatozoides, pode revelar a existência de uma variabilidade entre indivíduos e, deste modo, permitir o aperfeiçoamento do processo de seleção dos reprodutores e dos protocolos de criopreservação do sémen.

9.2. Material e métodos

No presente trabalho foram analisados ejaculados referentes a recolhas realizadas entre 9 de outubro de 2018 e 30 de setembro de 2019, no CRAHA, de 9 bodes da raça Serpentina, inscritos no Livro Genealógico da raça, e com idades compreendidas entre 3 e 5 anos. Foram excluídos os ejaculados referentes a recolhas do bode 4093, realizadas em janeiro e fevereiro, de modo a eliminar o fator da sazonalidade. Sendo que a época reprodutiva dos bodes começa no fim do verão e se prolonga pelo outono e inverno, quando o fotoperíodo é decrescente, as recolhas realizadas fora da época, quando o fotoperíodo começa a aumentar, têm revelado uma diminuição da qualidade dos ejaculados, principalmente da motilidade espermática, facto que prejudica o sucesso da criopreservação (Leboeuf et al. 2000). Para além disso, foram igualmente excluídos os ejaculados do bode 2122, dado possuir apenas dois ejaculados ao longo de todo o período em análise. A eliminação dos ejaculados dos bodes 4093 e 2122, reduziu a população amostral para 7 reprodutores. O número de ejaculados avaliados por bode, assim como as suas datas de recolha, estão registadas no Anexo 1.

Os bodes foram mantidos no Centro, em parques com capacidade para 2 a 4 animais. Nesses parques, os animais tinham acesso a bebedouros e a cama de palha limpa e eram alimentados, uma vez por dia, com ração Pheed® e feno.

Os animais foram mantidos em repouso sexual com o objetivo de recolha de sémen para criopreservação. O sémen foi recolhido com recurso a uma VA com o auxílio de uma fêmea em cio induzido. O ejaculado foi recolhido para um tubo esterilizado e graduado e,

imediatamente, encaminhado para avaliação. O sémen fresco foi avaliado macroscopicamente, quanto à cor, aspeto e volume, e microscopicamente, quanto à motilidade massal (0-5) e à motilidade individual progressiva, através de microscopia ótica com contraste de fase e platina térmica a 37°C (Olympus CX43, Japão) e foi determinada a concentração através de um espectrofotómetro (SDM1, Minitube®, Alemanha). As informações obtidas foram registadas em papel e em documento Excel® (Anexo 2).

Apenas ejaculados com motilidade espermática progressiva superior a 50% e morfologia espermática normal superior a 70% foram aprovados para criopreservação, diluídos com Andromed® (Minitube, Alemanha), acondicionados em mini-palhinhas francesas (IMV, L'Aigle, França), congeladas através do protocolo descrito no Anexo 3, ficando armazenadas em azoto líquido a -196°C. As palhinhas foram seladas com um tampão (álcool polivinílico) de cores diferentes, consoante o animal e identificadas com a marca da Exploração, o número de identificação oficial, o número de inscrição no Livro Genealógico e a data da colheita. Cada mini-palhinha tem uma capacidade para 0,25mL de sémen diluído e 200 milhões de espermatozoides.

Para ser avaliada a qualidade do sémen congelado, uma palhinha de cada recolha foi analisada quanto à motilidade, através de microscopia ótica. Apenas o sémen descongelado com uma motilidade individual progressiva superior a 20% foi considerado de boa qualidade e mantido em armazenamento, de modo a serem armazenadas apenas palhinhas referentes a ejaculados com boa qualidade seminal pós-descongelação.

Para o presente estudo, as amostras de sémen congelado foram novamente avaliadas subjetivamente, através de microscopia ótica e de esfregaços, para análise da vitalidade e da morfologia espermáticas, e foram igualmente sujeitas a testes complementares (teste hipo-osmótico e teste de termorresistência) e, finalmente, avaliadas através do sistema CASA.

9.2.1. Análise subjetiva

A análise subjetiva do sémen foi realizada de modo semelhante ao descrito por Santos (2006). As palhinhas de sémen foram descongeladas, em banho-maria, a 37°C durante 60 segundos, e avaliadas através de microscopia ótica (Olympus CX43, Japão), quanto à motilidade pela observação de uma gota de sémen entre lâmina e lamela, pré-aquecidas em placa térmica a 37°, a uma ampliação de 200x.

Para determinar a vitalidade e avaliar a morfologia espermática, foram realizados esfregaços das amostras de sémen em análise. A vitalidade foi determinada através de um esfregaço de uma gota de sémen corada com eosina-nigrosina, analisado por microscopia ótica (Olympus CX43, Japão), a uma ampliação de 200x, tendo sido escrutinados um mínimo de 100 espermatozoides (WHO 2010) (Figura 6). A morfologia espermática foi avaliada no

mesmo esfregaço, através de microscopia ótica (Olympus CX43, Japão), com ampliação de 400x, igualmente contando-se, no mínimo, 100 espermatozoides, registrando-se os defeitos da cauda (caudas dobradas ou enroladas), a presença de gotas citoplasmáticas distais e proximais, os defeitos da peça intermédia, os defeitos da cabeça e/ou do acrossoma e a presença de cabeças normais destacadas (WHO 2010).



Figura 6. Esfregaço corado com eosina-nigrosina para avaliar a vitalidade espermática (original da autora)

O espermatozoide com a cabeça corada estava morto na amostra analisada, uma vez que corante penetrou as suas membranas plasmáticas porosas.

9.2.2. Testes complementares

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada através do teste hipo-osmótico (HOST). Segundo Oliveira et al. (2013), recomenda-se a utilização de uma solução à base de citrato de sódio e de frutose com 100 mOsm/L para a avaliação do sémen de caprino. Para preparar esta solução, dissolveu-se 7,35g de citrato de sódio (Sigma-Aldrich®, Alemanha) e 13,51g de frutose (Merck KGaA®, Alemanha) em 1L de água bi-destillada (Penitente-Filho et al. 2015), que depois foi armazenada em tubos de polietileno a -20°C até ser utilizada (Fonseca et al. 2005).

A solução hipo-osmótica foi aquecida e acondicionada em tubos *ependorf* com 1mL de capacidade. Posteriormente, uma amostra de 10µL de sémen descongelado foi misturada na solução previamente aquecida e incubada em banho-maria a 37°C (Oliveira et al. 2013). As amostras foram analisadas 1 hora após o início do teste, numa preparação lâmina-lamela, pré-aquecidas a 37°C, contando-se 100 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase com ampliação de 400x (Figura 7).



Figura 7. Espermatozoides durante o teste hipo-osmótico (original da autora).

Na imagem do canto superior esquerdo, as setas indicam os dois espermatozoides que reagiram ao HOST; nas restantes imagens todos os espermatozoides reagiram ao teste e demonstram algum grau de enrolamento.

As células espermáticas foram classificadas quanto à presença de caudas enroladas e muito enroladas, de acordo com a Figura 8. O resultado foi expresso em percentagem, segundo a fórmula: $\%HOST = (\% \text{ caudas enroladas antes do teste}) - (\% \text{ caudas enroladas depois do teste})$ (Penitente-Filho et al. 2015).

O comportamento e a resistência dos espermatozoides foram avaliados através do teste de termorresistência (TTR) segundo o protocolo utilizado por Santos et al. (2006): as amostras de sêmen descongelado foram incubadas em tubos *eppendorf* em banho-maria a 37°C, durante 2 horas. Posteriormente, foi avaliada a motilidade das amostras através de m.o. com ampliação de 200x, nos tempos zero (5 minutos após o início do teste) e a cada hora.

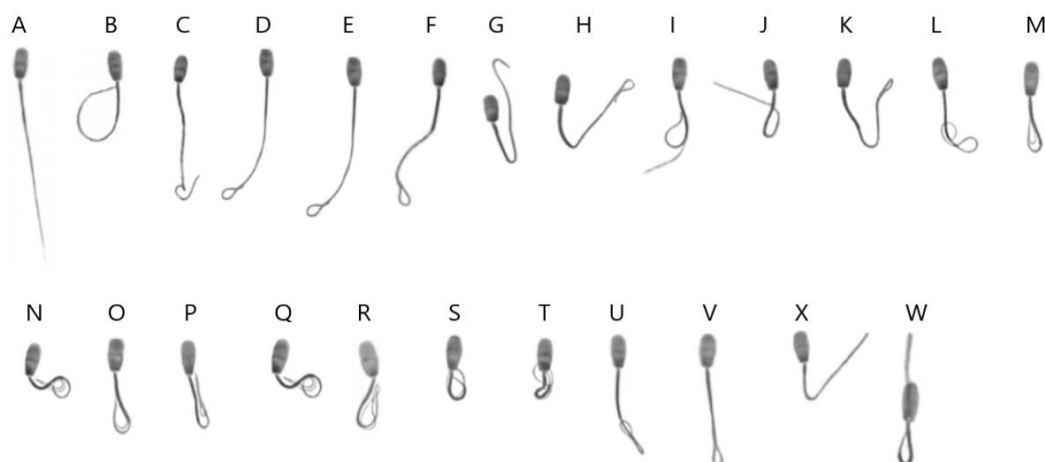


Figura 8. Espermatozoides de bode durante o teste hipo-osmótico com diferentes níveis de enrolamento (adaptado de Fonseca et al. 2005).

Microscopia com contraste de fase, ampliação de 1000x: (A) não enrolado, (B-J) espermatozoides enrolados e (K-W) espermatozoides muito enrolados.

9.2.3. Avaliação objetiva da cinética espermática através de um sistema CASA

O sémen foi posteriormente analisado no Pólo da Mitra, na Universidade de Évora, através de um sistema computadorizado de análise de sémen (CASA) (ISAS, Proiser SL, Valência, Espanha), com software ISAS® V1, com câmara PROISER C13-ON e com microscópio trinocular UB 203i (Proiser SL, Valência, Espanha).

As mini-palhinhas foram descongeladas em banho-maria a 37°C, durante 60 segundos, e o sémen diluído foi transferido para tubos *ependorf* pré-aquecidos e mantido a 37°C numa placa térmica. Para ser obtida uma concentração ótima para a análise do sémen através do CASA, à amostra foi adicionado o diluidor Andromed® (Minitub, Alemanha) pré-aquecido a 37°C, numa diluição de 1:12 (10µL de sémen para 110µL de diluidor), de modo a obter-se uma concentração estável de 67 milhões de espermatozoides/mL, para o registo de leituras fiáveis. Previamente, uma alíquota de 10µL do sémen diluído, numa preparação lâmina-lamela, foi avaliada subjetivamente por microscopia ótica com ampliação de 200x e, posteriormente, avaliada através do sistema CASA.

O programa do CASA foi definido para a espécie caprina e foi configurado com as definições apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Definições configuradas no sistema CASA

Parâmetro	Definição
Contraste	169
Luminosidade	470
Ótica	Ph
Câmara	Cover
Escala	10x

As restantes definições do sistema foram configuradas de acordo com o referido por Barbas et al. (2018): o número de imagens obtidas por segundo foi definido para 25 Hz e o número de imagens obtidas por objeto definido para 25; tamanho mínimo de um objeto no campo foi definido para 3 pixéis; a velocidade mínima para células espermáticas lentas foi definida para 10 µm/s (VAP>10 µm/s), sendo que abaixo dessa velocidade os objetos são considerados estáticos; o limite para espermatozoides com velocidade média foi definida para 45 µm/s (VAP>45 µm/s) e a velocidade mínima para espermatozoides rápidos foi definida para 75 µm/s (VAP>75 µm/s). O *cut-off* de retilinearidade foi definido para 75%, sendo que apenas espermatozoides com retilinearidade superior a esse valor são considerados progressivos. Para tornar a análise mais fidedigna, foram avaliados 5 campos aleatórios para

cada amostra de sémen, de modo a que o sistema calcule e apresente os valores dos parâmetros analisados.

O programa utilizado analisa 14 parâmetros cinéticos (definidores da velocidade e da linearidade) para cada espermatozoide, guardando essa informação em ficheiros Excel®. A definição de cada um dos parâmetros avaliados está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da motilidade espermática avaliados pelo sistema CASA (adaptado de Partyka et al. 2012; Barbas et al. 2018).

Parâmetro	Unidade de medida	Descrição
Velocidade curvilínea (VCL)	µm/s	Velocidade da trajetória real da célula
Velocidade linear progressiva (VSL)	µm/s	Velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide
Velocidade média da trajetória (VAP)	µm/s	Velocidade média da trajetória dos espermatozoides; será maior nos casos em que a trajetória da cabeça é pouco regular com maior desvio lateral
Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH)	µm/s	Amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide na sua trajetória real
Frequência do batimento flagelar cruzado (BCF)	Hz	Número de vezes em que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento
Retilinearidade (STR)	%	Relação percentual entre VSL e VAP; calcula a proximidade do percurso da célula a uma linha reta
Linearidade (LIN)	%	Relação percentual entre VSL e VCL; demonstra a percentagem de células que tem um índice de linearidade superior a 0,7, ângulo absoluto menor que 25° e ângulo algébrico menor que 3°
Índice de oscilação (WOB)	%	Rácio entre VAP e VCL
Motilidade total (MOT)	%	População de células que se movem a uma velocidade mínima ou acima dessa, determinada pelos valores das definições escolhidas
Motilidade progressiva (MOTP)	%	População de células que se movem ativamente em frente
Rápido (RAPID)	%	Subpopulação de células rápidas
Médio (MED)	%	Subpopulação de células com velocidade média
Lento (SLOW)	%	Subpopulação de células lentas
Estático (STATIC)	%	Subpopulação de células estáticas

9.2.4. Análise estatística

O registo dos dados recolhidos no presente trabalho foi efetuado através do programa Excel (Microsoft Office 2016®). O tratamento estatístico dos dados foi realizado através do *software* R, com recurso ao RStudio© (Versão 1.3.1093).

Os resultados estão expressos em Média \pm desvio padrão. A distribuição das variáveis foi avaliada através do teste estatístico Shapiro-Wilks, consideradas como tendo distribuição normal quando $p > 0,05$. Para a identificação de diferenças quanto ao nível de congelabilidade foi aplicado o teste T emparelhado ($p < 0,05$) em variáveis com distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) para variáveis com distribuição não normal. Para a identificação de diferenças entre indivíduos foi aplicado o teste de Tukey ($p < 0,05$) para variáveis de qualquer distribuição.

Para a avaliação das relações entre variáveis foram analisadas as correlações de Pearson ($p < 0,05$).

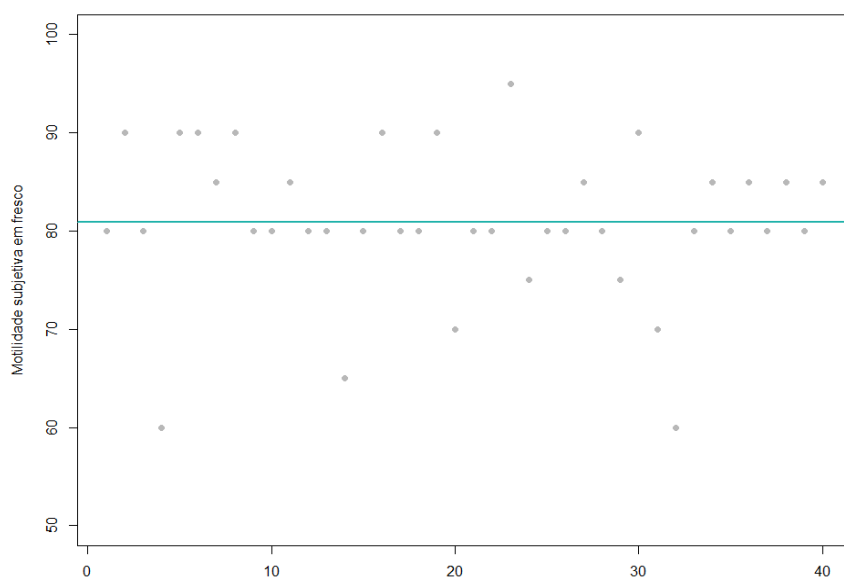
9.3. Resultados e discussão

9.3.1. Análise do sémen em fresco

No presente estudo foram avaliados 40 ejaculados que apresentavam uma concentração espermática média de $4,2 \times 10^9 \pm 0,29$ spz/mL. O valor normal da concentração espermática para caprinos varia entre $2,5 \times 10^9$ e $5,0 \times 10^9$ spz/mL (Castelo et al. 2008). Os ejaculados apresentaram uma motilidade massal média de 5.

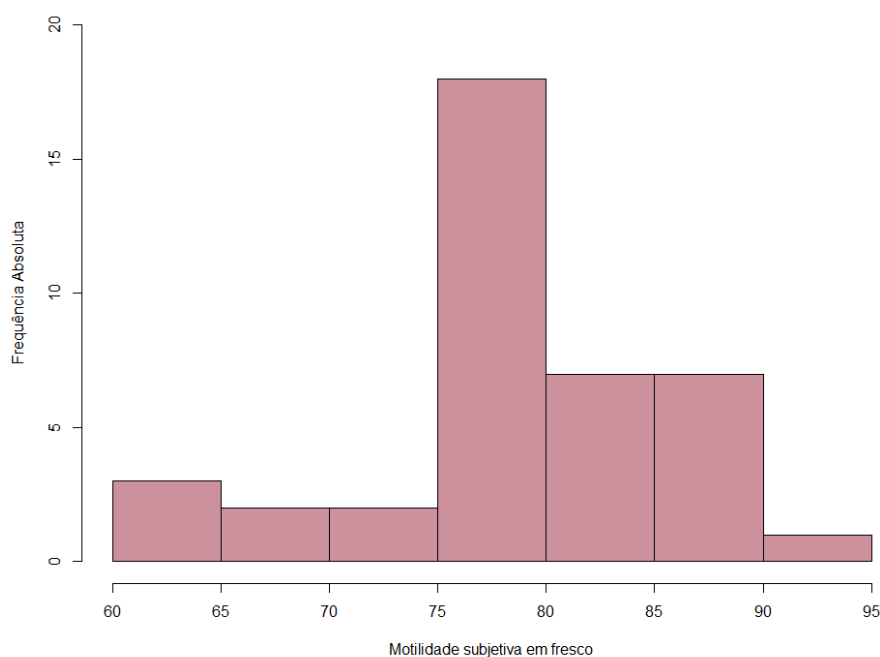
A motilidade espermática progressiva foi avaliada em fresco apresentando uma média de $80,88 \pm 7,75\%$ (Gráfico 1), tendo sido de 60% a mínima registada, ainda admissível para a criopreservação (Castelo et al. 2008). Quanto à sua distribuição na população considerada, o histograma abaixo (Gráfico 2) revela que a maior parte dos ejaculados avaliados apresentavam motilidade espermática entre 75% e 90% (32 ejaculados).

Gráfico 1. Dispersão da motilidade espermática em fresco (após a recolha) dos ejaculados avaliados (n=40)



A linha a verde representa a média da motilidade espermática, em fresco, da população amostral (n=40).

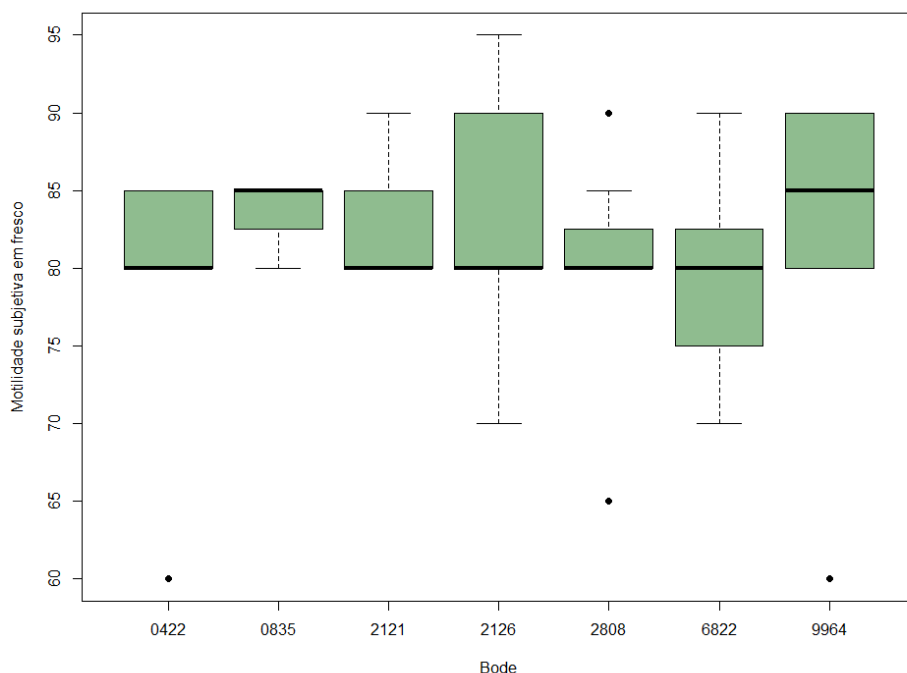
Gráfico 2. Distribuição da motilidade espermática da população amostral (n=40)



Para além da análise dos parâmetros seminais avaliados na população, a qualidade seminal foi também analisada por bode (n=7). A variação da motilidade espermática por indivíduo é apresentada no Gráfico 3 que mostra uma variabilidade pouco marcada, com a

maioria dos bodes a revelarem uma mediana de 80%. A sua análise permite ainda, identificar a diferença entre medianas de cada indivíduo que, neste caso, parecem ser semelhantes, sendo que a maioria dos indivíduos apresenta a mesma motilidade espermática mediana. O mesmo gráfico permite também analisar a dispersão dos valores da motilidade apresentados por cada indivíduo (tamanho da caixa), assim como comparar essa dispersão entre indivíduos. Para a motilidade espermática em fresco, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os bodes. Porém existe alguma dispersão dos valores das motilidades espermáticas (tamanho da caixa), sendo que os bodes 0835 e 2808 apresentaram uma menor dispersão de valores, apesar do último registar dois *outliers*. Quanto à análise dos parâmetros de motilidade massal, morfologia e concentração espermáticas não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre bodes.

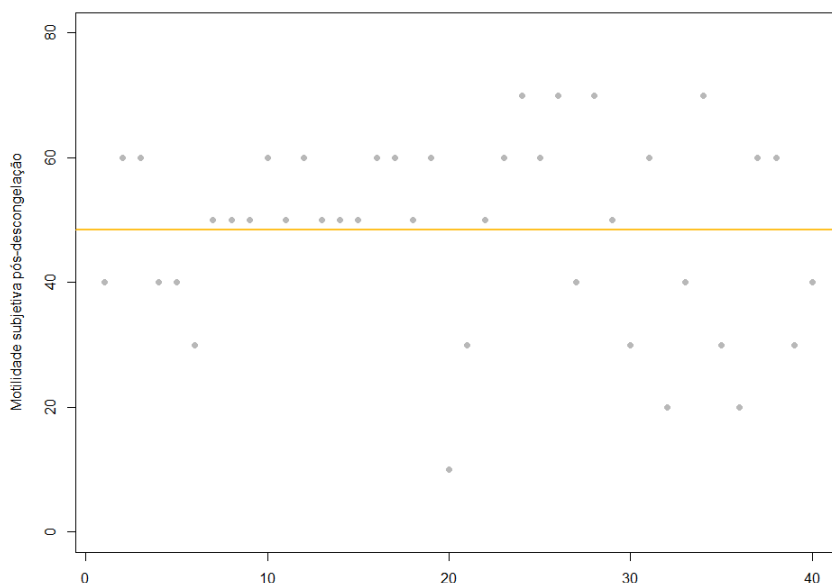
Gráfico 3. Distribuição da motilidade espermática dos ejaculados em fresco, por bode (n=7)



9.3.2. Análise do sémen descongelado

Depois do processo de criopreservação, a avaliação do sémen descongelado resultou numa motilidade espermática progressiva média de $48,5 \pm 14,94\%$. Os resultados apresentados são concordantes com os de Salamon e Maxwell (2000), que reportaram que, depois da descongelação, apenas 40 a 60% dos espermatozoides se mantêm móveis. O Gráfico 4 apresenta a motilidade espermática média pós-descongelação dos ejaculados avaliados, revelando que existe uma grande dispersão de valores.

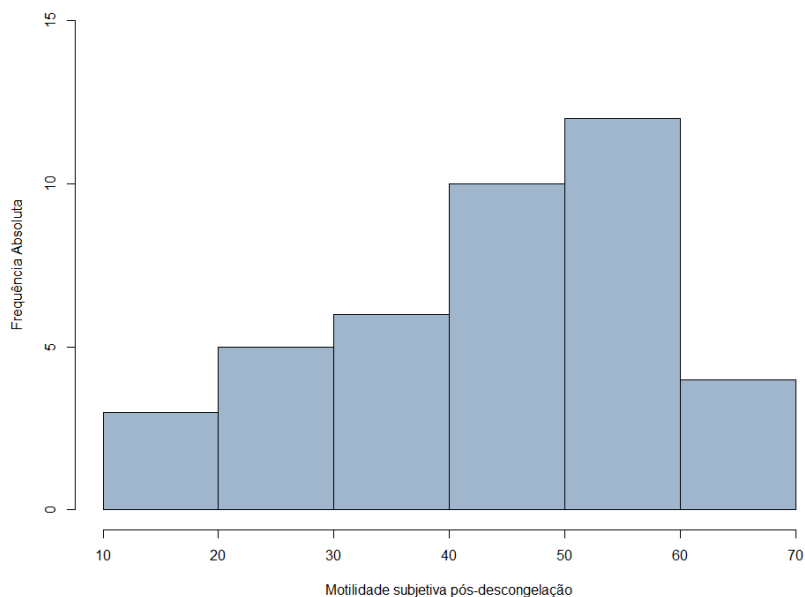
Gráfico 4. Dispersão da motilidade espermática pós-descongelamento dos ejaculados avaliados (n=40)



A linha amarela representa a média da motilidade pós-descongelamento da população amostral (n=40).

O Gráfico 5 ilustra a distribuição da motilidade pós-descongelamento pelos ejaculados, que apresentou uma maior variação (entre 10 e 70%), comparativamente com a motilidade em fresco que variou entre 60 e 95%. É possível ainda verificar que grande parte dos ejaculados apresentaram motilidade espermática entre 40 e 60% (22 ejaculados).

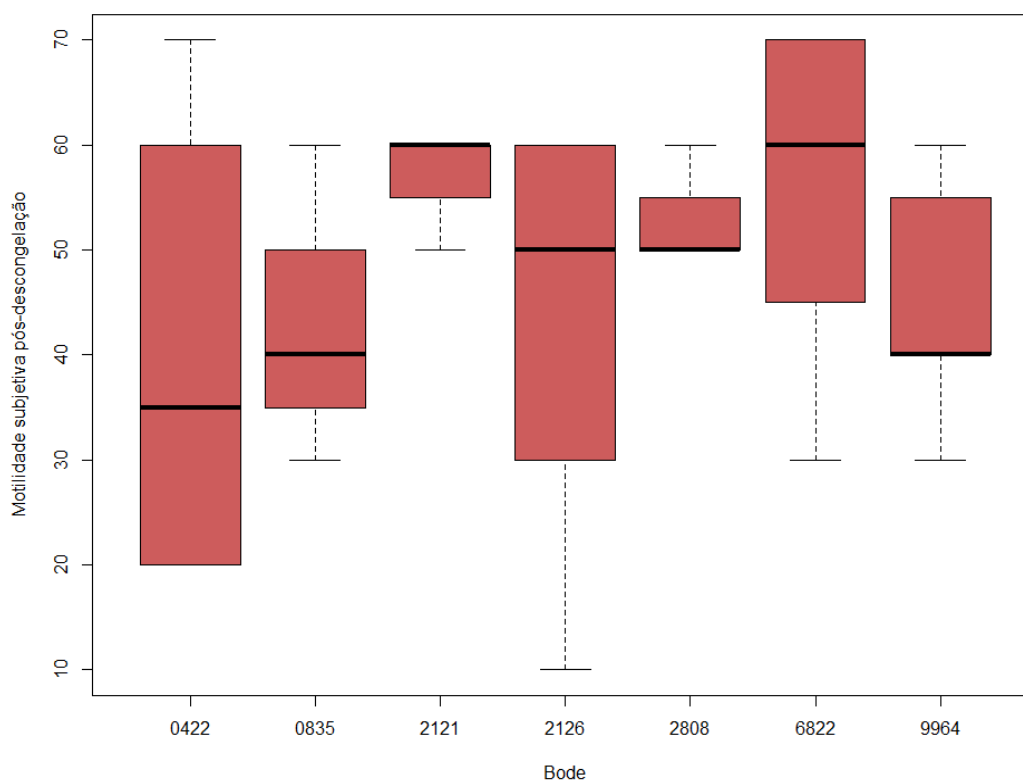
Gráfico 5. Distribuição da motilidade espermática pós-descongelamento na população amostral (n=40)



A variabilidade individual da motilidade espermática pós-descongelção foi analisada através do Gráfico 6, que regista uma diferença entre as suas medianas, assim como uma diferença na dispersão dos valores da motilidade por indivíduo (tamanho das caixas). Tal situação traduz uma variabilidade individual considerável quanto à motilidade do sémen descongelado e, também, uma variabilidade observável entre ejaculados de um mesmo indivíduo, patente nos diferentes tamanhos das caixas desse Gráfico. Os bodes 2121 e 2808 apresentam caixas de menor tamanho, indicando que os seus ejaculados apresentaram motilidades com valores mais constantes, contrariamente às dos bodes 0422 e 2126 que registaram motilidades de valores mais díspares.

Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$) entre indivíduos, quer na análise do sémen fresco, quer na do sémen descongelado. No entanto, após a análise dos Gráficos 3 e 6 é perceptível uma maior variabilidade no sémen descongelado, quer entre indivíduos, quer entre os ejaculados de um mesmo indivíduo. Um estudo realizado por Apu et al. (2012) encontrou uma diferença significativa entre a qualidade seminal do sémen fresco e a do descongelado, apesar de só reportar uma diferença significativa na variabilidade individual do sémen descongelado, facto que reforça a ideia de que a variabilidade individual é bastante evidente após o processo de criopreservação (Thurston et al. 2001).

Gráfico 6. Distribuição da motilidade espermática pós-descongelção dos ejaculados criopreservado, por bode (n=7)



Tal como preconizado por Sundararaman e Edwin (2008) e Casas et al. (2009), os ejaculados, no presente trabalho, foram separados por dois níveis de congelabilidade (alto e baixo) de acordo com a sua motilidade na avaliação subjetiva pós-descongelação. Ejaculados com mais de 30% de motilidade progressiva foram considerados como sendo de nível de congelabilidade alto ($n = 32$) e ejaculados com uma motilidade $\leq 30\%$, foram considerados como tendo baixo nível de congelabilidade ($n = 8$). Embora as causas desta variabilidade ainda não estejam totalmente esclarecidas, a possibilidade de distinguir os indivíduos pelo nível de congelabilidade dos ejaculados pode ser benéfico em situações como a conservação de espécies/raças ou quando indivíduos com baixo nível de congelabilidade tenham valor genético considerável e em que os protocolos de criopreservação específicos possam ser adaptados para melhorar a sobrevivência à descongelação, dos seus espermatozoides (Zee et al. 2009).

No presente estudo, o sémen descongelado foi avaliado para a integridade membranar através do teste hipo-osmótico (HOST), para a vitalidade (vivos) e para a morfologia espermática (normais) e as percentagens médias foram $39,45 \pm 12,64\%$, $48,65 \pm 13,31\%$ e $82,4 \pm 6,59\%$, respetivamente. A avaliação detalhada da morfologia espermática por tipo de defeitos e a sua frequência na população amostral é apresentada no Anexo 4.

O sémen criopreservado dos bodes neste estudo revelou alterações morfológicas quando exposto à solução hipo-osmótica e a sua resposta foi semelhante ao reportado por Santos et al. (2006).

As correlações entre o HOST, a vitalidade, a morfologia e a motilidade (subjetiva) à descongelação estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Correlações de Pearson (R) entre avaliações seminais (n=40)

	Motilidade pós-descongelação	Vitalidade	Morfologia espermática
HOST	0,37*	0,08	0,34*
Motilidade pós-descongelação	-	0,63**	0,09
Vitalidade	-	-	0,008

* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

O HOST apresentou correlação positiva com a motilidade pós-descongelação ($r=0,37$; $p < 0,05$), assim como com a morfologia espermática ($r=0,34$; $p < 0,05$). Correlações entre este teste e a motilidade espermática já tinham sido reportadas anteriormente (Nur et al. 2005; Penitente-Filho et al. 2015), variando entre correlações elevadas e moderadas. Uma das

funções mais importantes das membranas espermáticas é o transporte seletivo de moléculas, que pode ser observado quando a célula espermática é exposta a um ambiente hipo-osmótico (Penitente-Filho et al. 2015). O edema dos espermatozoides durante o HOST é indicador da integridade das suas membranas, enquanto a motilidade depende do transporte seletivo através das mesmas, mas também de outras funções bioquímicas, como o metabolismo espermático e a ação microtubular das fibras da região da cauda (Oliveira et al. 2013). O HOST testa principalmente a integridade da membrana da cauda, mas também é, provavelmente, um bom indicador da integridade da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide. Assume-se ainda que este teste é um indicador do estado metabólico e da capacidade do espermatozoide de sofrer alterações fisiológicas, como a capacitação e a hiperativação (Jeyendran et al. 1992).

A correlação do HOST com a morfologia espermática indica que a morfologia pode influenciar a integridade membranar e, conseqüentemente, a performance dos espermatozoides durante o teste, tendo sido encontrada uma relação semelhante por Lodhi et al. (2008) e Zubair et al. (2013). Porém, outros estudos reportam que ela não existe (Nur et al. 2005; Oliveira et al. 2013), sugerindo que a relação entre as duas ainda é controversa.

A coloração supra-vital usada para determinar a vitalidade do sémen, depende do princípio de as células mortas terem as suas membranas danificadas o que permite que o corante as atravesse, corando a célula (membranas intactas são impermeáveis ao corante); o HOST não só avalia a integridade das membranas plasmáticas, como a sua atividade osmótica (Partyka et al. 2012). No presente estudo, não foi encontrada qualquer correlação entre a vitalidade e o HOST; o que está em concordância com Nur et al. (2005) e Oliveira et al. (2013), mas em oposição ao estudo de Lodhi et al. (2008). As diferenças entre o HOST e a vitalidade resultam, provavelmente, do facto de um espermatozoide ter de apresentar membranas espermáticas intactas, física e quimicamente, para reagir àquele teste, enquanto a eosina-nigrosina avalia apenas se a membrana está porosa, como resultado da morte da célula (Jeyendran et al. 1992).

É de salientar que, poderá ser possível que a ausência de correlação entre o HOST e as avaliações mais rotineiras de sémen, como a vitalidade, possa significar que aquele teste tenha um especial interesse diagnóstico, por avaliar uma característica diferente das que já são medidas por outros testes (Jeyendran et al. 1992).

Registou-se ainda uma correlação positiva entre a motilidade à descongelção e a vitalidade, avaliada no sémen descongelado ($r=0,63$; $p<0,001$), também encontrada por outros autores (Lodhi et al. 2008). Esta relação era expectável, uma vez que apenas espermatozoides vivos, com metabolismo e ação microtubular da cauda normais, revelam uma motilidade normal (Oliveira et al. 2013).

A ausência de correlação entre a motilidade pós-descongelação e a morfologia espermática é explicada por O'Connell et al. (2002), uma vez que o grau de diminuição do número de espermatozoides móveis e progressivos, assim como a diminuição da sua velocidade, é compatível com o grau de diminuição da atividade mitocondrial causado por danos criogénicos que desencadeiam um processo idêntico à apoptose. Tal facto, indica que existe uma relação mais forte entre a motilidade e a função mitocondrial, do que com a morfologia espermática normal.

Os valores médios do HOST, da vitalidade, da morfologia e da motilidade pós-descongelação, por nível de congelabilidade dos ejaculados estão registados na Tabela 4. Verificou-se que os resultados do HOST e os da morfologia não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) nos ejaculados com diferentes níveis de congelabilidade. Pelo contrário, observou-se uma diferença estatisticamente significativa para a motilidade (subjéctiva) pós-descongelação ($*p < 0,001$) e para a vitalidade ($**p < 0,05$), indicando que os ejaculados considerados de alta congelabilidade (motilidade pós-descongelação $> 30\%$) apresentaram uma percentagem de espermatozoides móveis e vivos significativamente superior aos considerados de baixa congelabilidade.

Tabela 4. Valores (média \pm desvio padrão) da motilidade pós-descongelação (subjéctiva), teste hipo-osmótico (HOST), morfologia espermática e vitalidade dos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)

Nível de congelabilidade	Motilidade pós-descongelação (%)	HOST (%)	Morfologia normal (%)	Vitalidade (%)
Alto	54,37 \pm 9,48*	40,62 \pm 13,14	82,37 \pm 6,17	51,13 \pm 13,25**
Baixo	25,0 \pm 7,56	34,75 \pm 9,69	82,5 \pm 8,54	38,75 \pm 8,29

* $p < 0,001$; ** $p < 0,05$

Sabendo-se que o processo de criopreservação é responsável pela diminuição da integridade das membranas e pelo aumento de lesões espermáticas (O'Connell et al. 2002), os resultados deste estudo indicam que, independentemente do nível de congelabilidade do ejaculado, o sémen é afetado de modo semelhante. Outros autores reportaram que os resultados do HOST variavam entre indivíduos e, entre amostras de sémen do mesmo indivíduo (Fonseca et al. 2005).

Os valores médios das variáveis em discussão estão apresentados, por bode, na Tabela 5. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores do

HOST e na morfologia espermática. Porém, foram encontradas diferenças significativas na vitalidade entre o indivíduo 2121 e os indivíduos 0835 (^ap<0,01), 0422 (^bp<0,05) e 9964 (^ap<0,05). Estes resultados sugerem que a variabilidade individual pode ser apreciada na proporção de espermatozoides vivos e móveis no sêmen descongelado, uma consequência direta do processo de criopreservação. Porém, o presente estudo não encontrou diferenças individuais nos parâmetros do HOST e morfologia espermática. Fonseca et al. (2005) relataram diferenças nas médias nos valores de HOST entre bodes e, Apu et al. (2012) registaram diferenças na percentagem de espermatozoides defeituosos entre indivíduos. A ausência de uma variabilidade individual nestes parâmetros parece indicar que o processo congelação-descongelação não os influenciou.

Tabela 5. Valores percentuais (média ± desvio padrão) por bode, da motilidade pós-descongelação (subjativa), HOST, morfologia espermática e vitalidade dos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) e baixo (n=8)

Bode	Motilidade pós-descongelação	HOST	Morfologia	Vitalidade
0422	40,00±20,98	40,83±10,76	81,50±5,96	39,33±13,11 ^b
0835	43,33±15,27	42,33±11,01	86,00±4,00	33,33±11,68 ^a
2121	56,67±5,77	50,67±18,58	85,00±1,00	69,00±2,00 ^{a, b}
2126	43,33±19,66	35,00±12,39	82,33±9,33	50,50±14,62
2808	52,86±4,88	39,57±10,60	81,14±9,10	50,71±9,99
6822	56,25±15,06	38,75±12,35	81,25±5,82	53,50±13,04
9964	45,71±11,34	36,71±16,42	83,14±6,07	14,29±4,50 ^b

^a p<0,01; ^b p<0,05

Apesar das diferenças entre as espécies, o HOST é adequado para a avaliação das membranas plasmáticas dos espermatozoides do bode. É possível que possa ser uma ferramenta valiosa para uma análise mais exata da célula espermática individual, do que da população como um todo (Fonseca et al. 2005).

O teste da termorresistência (TTR) foi realizado durante 2 horas e o sêmen incubado foi avaliado aos 5, 60 e 120 minutos, apresentando percentagens médias de motilidade de 37,5±13,01%, 12,48±11,35% e 5,2±7,02%, respetivamente. Como anteriormente referido por Santos et al. (2006) e Barros et al. (2013), no presente trabalho, a motilidade espermática progressiva apresentou valores altos nos primeiros minutos do teste, diminuindo nas horas

intermédias e estabilizando em valores mais baixos, no fim do teste. Porém, os resultados agora registados são inferiores aos referidos por Santos et al. (2006), num outro trabalho também realizado com bodes. São vários os fatores que influenciam a performance dos espermatozoides durante o TTR, tais como, o diluidor utilizado, o tempo de incubação, o volume da amostra e a concentração espermática (Cunha et al. 2012), para além da variabilidade individual, da raça e da idade (Schulze et al. 2019). Tendo em consideração as variáveis descritas, é possível que os resultados obtidos neste estudo, ainda que inferiores aos de outros autores (Santos et al. 2006), sugiram que os bodes de raça Serpentina utilizados possam ter um padrão semelhante de qualidade seminal pós-descongelção.

A redução da motilidade espermática nas amostras sujeitas ao TTR é consequência da permanência dos espermatozoides sob o efeito de temperaturas elevadas, por longo período de tempo. Acredita-se que esta temperatura elevada leva ao aumento do metabolismo espermático e, conseqüentemente, a um rápido consumo dos constituintes do diluidor, resultando num défice energético e numa maior produção de metabolitos (Vianna et al. 2009; Talini et al. 2019). Esta alteração na energia disponível para as células espermáticas, justifica que as amostras com menor motilidade espermática inicial, tenham melhor performance no TTR, uma vez que existe uma menor competição entre as células pelos nutrientes disponíveis no meio, com menos metabolitos a serem produzidos, levando a que os poucos espermatozoides móveis possam manter essa motilidade por mais tempo e com maior vigor (Talini et al. 2019). Para além desta explicação, o declínio da motilidade durante o teste pode ainda dever-se à perda de componentes intracelulares ou de lesões estruturais na cauda dos espermatozoides (Barros et al. 2013).

No presente estudo, apenas foi encontrada uma correlação entre a motilidade avaliada (subjetivamente) à descongelção e a motilidade espermática avaliada aos 120 minutos do TTR ($r=0,37$; $p<0,05$), indicando que ejaculados com melhor qualidade pós-descongelção mantiveram uma melhor motilidade, no final do teste. No entanto, a presença dessa correlação, bem como a ausência de correlação entre a motilidade espermática pós-descongelção e as restantes avaliações do TTR (aos 5 e aos 60 minutos) indicam que o mesmo não é capaz de prever o comportamento do sémen ao longo do tempo.

Não foi encontrada qualquer correlação entre a motilidade em fresco, avaliada à colheita, e os resultados do TTR, indicando que, contrariamente ao reportado por Santos et al. (2006), os ejaculados com melhor qualidade à colheita não apresentaram melhores resultados.

Os valores médios do TTR estão descritos na Tabela 6, por nível de congelabilidade das amostras de sémen.

Tabela 6. Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da motilidade espermática nas avaliações do teste de termorresistência (TTR) nos ejaculados com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)

Nível de congelabilidade	Tempo de incubação (min)		
	5	60	120
Alto	38,91 \pm 13,42	12,63 \pm 12,09	6,06 \pm 7,56*
Baixo	31,87 \pm 9,98	11,87 \pm 4,42	1,75 \pm 2,19

*p<0,001

Foi observada uma diferença estatisticamente significativa (*p<0,001) aos 120 minutos do TTR, contrariando a teoria anteriormente referida. Os dados apresentados sugerem que ejaculados com alto nível de congelabilidade (melhor qualidade seminal pós-descongelação) apresentam maior longevidade durante o teste e, conseqüentemente, maior longevidade no trato genital feminino.

Na Tabela 7 estão registados os valores médios do TTR por indivíduo. Apenas foram observadas diferenças estatisticamente significativas aos 5 minutos do teste entre o bode 9964 e os bodes 2121 (^a p<0,01), 2126 (^b p<0,05), 2808 (^b p<0,05) e 6822 (^a p<0,01).

Tabela 7. Valores percentuais (média \pm desvio padrão) da motilidade espermática nas avaliações do TTR, por bode (n=7)

Bode	Tempo de incubação (min)		
	5	60	120
0422	33,33 \pm 8,16	14,17 \pm 8,61	4,00 \pm 2,53
0835	40,00 \pm 10,00	11,66 \pm 2,89	1,67 \pm 2,89
2121	50,00 \pm 17,32 ^a	25,00 \pm 21,79	10,0 \pm 5,0
2126	40,83 \pm 12,01 ^b	8,17 \pm 10,80	1,17 \pm 2,04
2808	41,43 \pm 11,80 ^b	8,43 \pm 8,52	5,14 \pm 5,43
6822	43,75 \pm 7,44 ^a	19,63 \pm 12,81	11,5 \pm 11,63
9964	20,71 \pm 8,86 ^{a, b}	5,57 \pm 3,31	2,0 \pm 3,65

^a p<0,01; ^b p<0,05

Apesar de outros autores (Cunha et al. 2012; Schulze et al. 2019) reportarem a existência de variabilidade individual, esta limitou-se aos resultados no final do TTR. No entanto, Cunha et al. (2012) afirmaram ainda, que as variações individuais observadas se deviam à variação do volume de sémen testado, o que não se aplica ao presente trabalho, uma vez que as amostras avaliadas no TTR tinham todas o mesmo volume. No caso apresentado, apenas podemos concluir que o sémen do bode 9964 é menos resistente ao

TTR e, por isso, é possível que possa ter uma pior qualidade seminal *in vivo*; ainda que alguns autores (Vianna et al. 2009) defendam que o teste em questão não recria completamente as condições uterinas, uma vez que o trato genital feminino contém muitas substâncias (antioxidantes, hormonas, fatores nutricionais) que contribuem para a manutenção da viabilidade espermática até ao momento da fertilização.

Os resultados da avaliação dos ejaculados criopreservados através do sistema CASA são apresentados na Tabela 8. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os ejaculados com diferente nível de congelabilidade nos parâmetros de motilidade, MOT (*p<0.001) e MOTP (*p<0.001) e, nos parâmetros cinéticos, VAP (*p<0.001), VCL (*p<0.001), VSL (*p<0.05) e ALH (*p<0.05). Estes resultados indicam que as amostras com nível de congelabilidade alto sofreram um declínio menos acentuado nestes parâmetros. Resultados semelhantes foram reportados por Sundararaman e Edwin (2008), cujo estudo também demonstrou que, apesar de todos os ejaculados mostrarem um declínio pós-descongelção em todos os parâmetros, os ejaculados com baixo nível de congelabilidade sofreram um declínio muito superior nos parâmetros de velocidade (VAP, VSL e VCL).

Tabela 8. Valores médios (média \pm desvio padrão) dos parâmetros avaliados pelo sistema CASA no sémen descongelado com nível de congelabilidade alto (n=32) ou baixo (n=8)

Parâmetros CASA	Nível de congelabilidade	
	Alto	Baixo
MOT (%)	79,02 \pm 11,52**	43,41 \pm 16,50
MOTP (%)	19,22 \pm 5,33**	9,31 \pm 3,15
VCL (μm/s)	89,85 \pm 11,12**	69,50 \pm 13,28
VSL (μm/s)	35,95 \pm 7,05*	28,83 \pm 8,64
VAP (μm/s)	57,29 \pm 8,81**	42,42 \pm 10,43
LIN (%)	42,09 \pm 4,65	40,92 \pm 6,52
STR (%)	66,01 \pm 4,1	67,30 \pm 5,77
WOB (%)	63,63 \pm 3,86	60,54 \pm 5,09
ALH (μm)	4,38 \pm 0,34*	3,93 \pm 0,4
BCF (Hz)	8,43 \pm 1,26	8,14 \pm 1,13

*p<0,05; **p<0,001

A alteração nos parâmetros motilidade, cinética e velocidade registada para o sémen descongelado deve-se provavelmente à alteração da pressão osmótica consequente à adição do crioprotetor (Sundararaman and Edwin 2008). Para além dos danos mencionados anteriormente, a criopreservação é responsável pelo aumento da proporção de espermatozoides mortos, que não resistem ao processo (Sundararaman and Edwin 2008), e

a alteração dos parâmetros cinéticos e de velocidade, pode dever-se à presença de uma maior população de células espermáticas que sofreram capacitação e/ou hiperativação (HA) (Maxwell and Watson 1996). Os espermatozoides que sofrem HA apresentam um movimento vigoroso, não progressivo e não linear, associado à capacitação (Partyka et al. 2012). O padrão do movimento espermático sofre alterações caracterizadas por movimentos laterais de grande amplitude, da cabeça e da cauda, com movimento 'star-spin' não progressivo ou lento (Verstengen et al. 2002). Durante esta fase, os espermatozoides hiperativados registam um aumento de alguns parâmetros do CASA, como a ALH, a VAP e a VSL, enquanto a LIN e a STR, diminuem (Partyka et al. 2012).

É de especial importância referir que a morte seletiva dos espermatozoides mais enfraquecidos ou imóveis, durante o processo de criopreservação, leva a um 'pseudo-aumento' nos parâmetros cinéticos do CASA, frequentemente referido como o paradoxo do CASA. Assim, as médias da velocidade e da cinética podem ser superiores após a descongelação, uma vez que a subpopulação mais resistente ao processo de criopreservação, pode exibir parâmetros com médias mais elevadas do que a maioria da população geral no sémen fresco (Partyka et al. 2012).

Os bodes avaliados foram classificados de acordo com o seu nível de congelabilidade. Os considerados de alto nível de congelabilidade apresentaram uma média de motilidade (subjetiva) à descongelação superior a 30% e uma covariância inferior a 0,1, indicando que os ejaculados desses machos registaram valores de motilidade constantes, não variando mais de 10% entre si. Apesar de não terem sido encontradas referências bibliográficas que suportem esta classificação, considerou-se a consistência da qualidade seminal entre ejaculados, uma característica importante em programas de recolha e criopreservação de sémen. Resumidamente, um indivíduo de alto nível de congelabilidade produz ejaculados com elevada motilidade após a descongelação, sendo pouco variáveis entre si.

Apenas os bodes 2121 e 2808 foram considerados como tendo alto nível de congelabilidade, sendo que todos os ejaculados que produziram apresentaram motilidade pós-descongelação superior a 30% e a covariância entre a motilidade desses ejaculados foi menor que 0,1. Os resultados da análise do sémen descongelado através do sistema CASA estão descritos na Tabela 9, discriminados por indivíduo, não tendo sido encontradas diferenças significativas nos parâmetros do CASA, exceto para o BCF que foi significativamente diferente (^a $p < 0,05$) entre os bodes 2121 e 6822.

Tabela 9. Valores médios (média \pm desvio padrão) dos parâmetros de velocidade e cinética avaliados pelo CASA, por bode (n=7)

Parâmetros	Bode						
CASA	0422	0835	2121	2126	2808	6822	9964
MOT (%)	58,38 \pm 21,68	51,57 \pm 28,44	74,27 \pm 2,68	68,43 \pm 22,15	73,99 \pm 6,88	73,23 \pm 18,68	67,70 \pm 12,25
MOTP (%)	12,58 \pm 5,71	12,18 \pm 3,81	20,92 \pm 3,36	18,28 \pm 9,47	18,19 \pm 3,52	20,52 \pm 7,65	16,24 \pm 3,59
VCL (μm/s)	85,67 \pm 12,77	81,57 \pm 18,05	94,58 \pm 12,26	85,94 \pm 25,03	83,92 \pm 8,07	89,06 \pm 15,21	81,89 \pm 7,17
VSL (μm/s)	35,16 \pm 8,41	34,24 \pm 9,06	40,38 \pm 7,25	35,76 \pm 13,34	35,54 \pm 3,93	39,35 \pm 9,69	33,11 \pm 4,32
VAP (μm/s)	53,38 \pm 9,58	50,52 \pm 13,98	58,99 \pm 7,50	54,21 \pm 19,07	53,74 \pm 4,69	59,01 \pm 12,73	50,04 \pm 4,39
LIN (%)	40,89 \pm 7,03	41,72 \pm 2,56	42,66 \pm 5,42	40,54 \pm 4,89	42,55 \pm 4,50	43,87 \pm 5,56	40,54 \pm 4,75
STR (%)	65,39 \pm 6,18	68,22 \pm 5,94	68,13 \pm 3,88	65,29 \pm 2,76	66,20 \pm 4,22	66,42 \pm 4,56	66,12 \pm 5,02
WOB (%)	62,19 \pm 4,55	61,36 \pm 4,77	62,54 \pm 5,79	61,93 \pm 5,16	64,13 \pm 3,0	65,85 \pm 4,30	61,18 \pm 3,02
ALH (μm)	4,50 \pm 0,33	3,95 \pm 0,58	4,22 \pm 0,25	4,36 \pm 0,56	4,25 \pm 0,39	4,14 \pm 0,22	4,41 \pm 0,37
BCF (Hz)	8,0 \pm 0,90	9,45 \pm 2,75	10,32 \pm 2,24 ^a	8,10 \pm 0,83	8,24 \pm 0,74	7,71 \pm 0,42 ^a	8,51 \pm 0,48

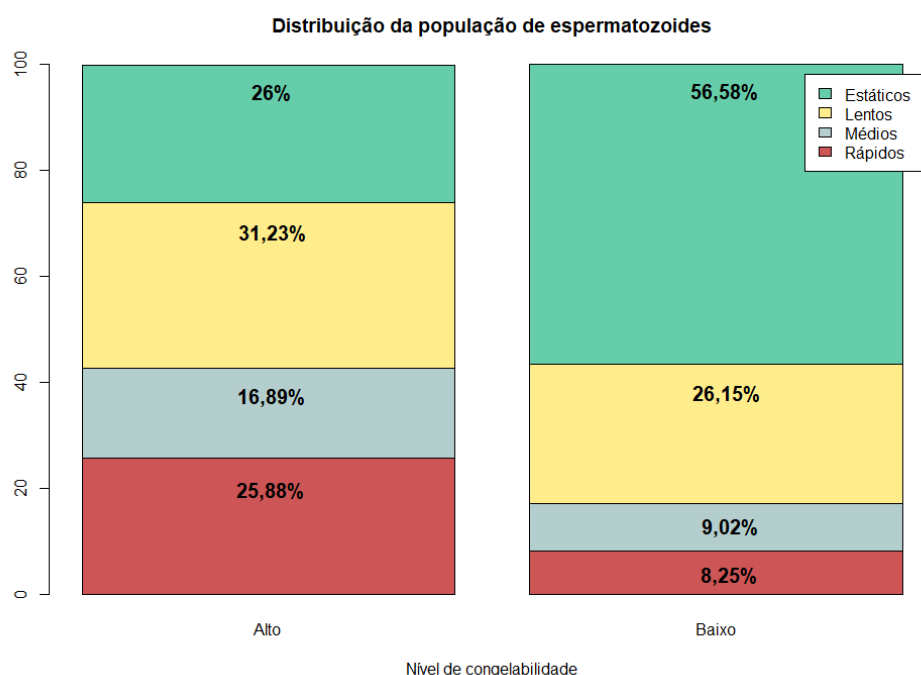
^a p<0,05

Os valores elevados do desvio padrão indicam que os ejaculados de alguns machos são altamente variáveis. Tal situação significa que, apesar de um macho produzir um ejaculado de elevada qualidade pós-descongelamento, produz outros com baixa congelabilidade, o que o torna, no geral, um indivíduo com baixo nível de congelabilidade. É possível que esta situação seja uma consequência da aplicação de protocolos de criopreservação ‘universais’, podendo ser vantajoso o desenvolvimento de vários protocolos específicos para cada espécie, com um desenho próprio para cada grupo de animais com uma crio-sensibilidade semelhante, ou mesmo para indivíduos que não respondem aos protocolos previamente utilizados (Zee et al. 2009).

O sistema CASA providencia ainda uma informação acerca da população de espermatozoides de acordo com a velocidade do seu movimento, dividindo-a em espermatozoides rápidos, médios (velocidade média), lentos e estáticos (imóveis). O

Gráfico 7 ilustra a constituição média da população dos ejaculados com diferentes níveis de congelabilidade. Esta análise mostrou diferenças significativas nas subpopulações de espermatozoides rápidos ($p<0,001$), médios ($p<0,001$) e estáticos ($p<0,001$) entre os ejaculados com diferente congelabilidade. É expectável que os ejaculados com nível de congelabilidade mais alto apresentem uma proporção maior de espermatozoides rápidos do que ejaculados com pior congelabilidade; da mesma forma que é expectável que apresentem uma menor percentagem de espermatozoides estáticos, uma vez que esta subpopulação representa os espermatozoides que morreram devido ao processo de criopreservação ou que sofreram danos criogénicos, que impossibilitam o seu movimento. Encontrou-se, neste estudo, uma correlação negativa entre a percentagem de espermatozoides estáticos e a vitalidade ($r=-0,63$; $p<0,001$), o que valida o acima referido, uma vez que a vitalidade representa a percentagem de espermatozoides vivos, e daí ter uma relação inversa com a percentagem de espermatozoides estáticos ou mortos.

Gráfico 7. Constituição da população espermática (%) de acordo com a velocidade dos espermatozoides dos ejaculados com nível de congelabilidade alto ($n=32$) ou baixo ($n=8$)



A análise estatística dos ejaculados indicou existirem diferenças significativas na constituição das populações de espermatozoides, apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre machos. Isso significa que, apesar dos ejaculados variarem entre si na sua constituição, os machos, no geral, não apresentaram essa variação. Segundo Dorado, Molina, et al. (2010), a estrutura das subpopulações espermáticas difere entre

machos e entre ejaculados do mesmo macho, o pode justificar a presença de espermatozoides com diferentes características num único ejaculado. O processo de criopreservação leva ao declínio da motilidade espermática, no geral, e à alteração da distribuição (percentagem de espermatozoides) entre subpopulações, o que poderá estar relacionado com alterações fisiológicas (capacitação e HA) sofridas pelas células espermáticas (Barbas et al. 2018).

Ensaio realizados por Dorado, Molina, et al. (2010) e Barbas et al. (2018) revelaram que o sémen descongelado apresentava 4 subpopulações de espermatozoides mediante o seu comportamento cinético: espermatozoides rápidos e lineares; espermatozoides mais lentos com alguma linearidade; espermatozoides com movimento rápido e não linear e, uma última, de movimento lento e não linear. O comportamento espermático, assim como a estruturação da população, são condicionados pelo indivíduo, pela concentração espermática e pela motilidade total, tendo em conta que o número de espermatozoides e a motilidade afetam as suas trajetórias, modulando igualmente a percentagem e as características cinéticas das subpopulações móveis dos ejaculados de bode (Contra et al. 2010; Dorado, Molina et al. 2010). No presente estudo, não foi encontrada qualquer relação entre a concentração e a distribuição da população, uma vez que os ejaculados foram diluídos para uma mesma concentração espermática (200 milhões por palhinha). No entanto, foram registadas correlações positivas entre a motilidade total (MOT) e a percentagem de espermatozoides rápidos ($r=0,74$; $p<0,001$), médios ($r=0,82$; $p<0,001$) e lentos ($r=0,52$; $p<0,001$), indicando que este parâmetro influencia a distribuição da população dos espermatozoides, por via da sua velocidade.

9.3.3. Alteração da viabilidade do sémen criopreservado

Neste estudo, a percentagem da motilidade foi reduzida significativamente ($p<0,001$) para 48,5% após a descongelação, uma diminuição na ordem dos 30%. Resultados semelhantes na comparação da motilidade em fresco e pós-descongelação foram reportados por Ahmad et al. (2014). A redução da motilidade no sémen descongelado pode ter várias causas, tais como a formação de cristais de gelo intra e extra-celulares que provocam danos às células espermáticas (Bezerra 2010), as lesões mitocondriais e na peça intermédia que alteram a produção energética dos espermatozoides (Gillan et al. 2004), o stress oxidativo que resulta em danos estruturais e destabilização das membranas (Maxwell and Watson 1996) e as alterações na fluidez das membranas plasmáticas devido ao arrefecimento, que levam à perda da sua integridade e funcionalidade (Lemma 2011).

Segundo Dorado et al. (2009), os parâmetros do sémen fresco que têm maior poder preditivo para a qualidade seminal pós-descongelação são a motilidade total, avaliada pelo

sistema CASA, e a percentagem de defeitos morfológicos. As correlações entre as avaliações seminais realizadas neste estudo encontram-se descritas na Tabela 10. A motilidade em fresco foi avaliada através de microscopia ótica (subjetivamente) e não apresentou correlação ($p>0,05$) com a motilidade espermática pós-descongelação quando avaliada subjetivamente.

Tabela 10. Correlações de Pearson (R) entre as avaliações seminais subjetivas (m.o.) e objetivas (sistema CASA) (n=40)

		Subjetiva	Objetiva	
		Motilidade pós-descongelação	MOT	MOTP
Subj.	Motilidade fresco	0,2	0,31*	0,22
	Motilidade pós-descongelação	-	0,79**	0,81**
Obj.	MOT	-	-	0,72**

* $p<0,05$; ** $p<0,001$

No entanto, revelou uma correlação positiva com a MOT ($r=0,31$; $p=0,05$) avaliada pelo sistema CASA, no sémen descongelado. A correlação entre estes dois parâmetros indica que é possível afirmar que, ejaculados com melhor motilidade em fresco, apresentam após a descongelação, valores mais elevados de motilidade total, quando avaliados por CASA. Este resultado indica que o parâmetro da motilidade avaliada subjetivamente em sémen fresco pode ter algum valor na previsão da qualidade seminal pós-descongelação. Dado que grande parte dos laboratórios de andrologia veterinária não têm acesso a sistemas computadorizados de análise de sémen, é útil saber-se que a motilidade em fresco apresenta algum valor preditivo, não obstante a qualidade seminal avaliada antes da congelação não facultar um juízo preciso sobre a congelabilidade do ejaculado, o que significa que algumas das características convencionais do sémen fresco podem ter pouca influência no sémen refrigerado ou congelado (Casas et al. 2009). A morfologia espermática não apresentou qualquer relação com a qualidade do sémen descongelado, uma vez que a informação disponível acerca desse parâmetro limitou-se ao facto de todos os ejaculados incluídos no estudo terem menos de 30% de defeitos morfológicos.

A motilidade em fresco também apresentou uma correlação positiva com alguns parâmetros do CASA, como a VCL ($r=0,36$; $p<0,05$) e a ALH ($r=0,37$; $p<0,05$); o que indica que as amostras com maior motilidade em fresco registaram, após a descongelação, valores mais elevados naqueles parâmetros. Resultados semelhantes foram encontrados por Dorado et al. (2009), o que significa que este parâmetro medido em fresco poderá ser um preditor útil para o comportamento do sémen após a criopreservação, ainda que não tenha revelado

correlação com os restantes parâmetros cinéticos avaliados pela CASA. É possível que, com a congelação, a velocidade dos espermatozoides possa ter um papel mais importante na determinação da sua sobrevivência pós-descongelação, do que somente a quantificação da percentagem dos espermatozoides móveis (Sundararaman and Edwin 2008).

9.3.4. Comparação das avaliações subjetiva e objetiva

O valor da avaliação subjetiva comparativamente com o da avaliação objetiva realizada através do sistema CASA, foi analisado através de correlações de Pearson (Tabela 10). A avaliação subjetiva da motilidade espermática pós-descongelação correlacionou-se positivamente com os parâmetros da avaliação do sistema CASA, a MOT ($r=0,79$; $p<0,05$) e a MOTP ($r=0,81$; $p<0,01$), o que significa que a avaliação microscópica, mais sujeita à influência do observador, teve uma relação estatisticamente relevante com a avaliação do CASA. Num estudo realizado por Broekhuijsen et al. (2011), não foi encontrada qualquer correlação entre a avaliação subjetiva por m.o. e a avaliação objetiva pelo sistema CASA. Contrariamente, Gallego et al. (2018) registaram correlações entre as duas avaliações, ainda que o grau de experiência do técnico seja um fator chave para a obtenção de análises mais precisas, quer através da m.o., quer através de sistemas de análise de sémen como a CASA. É impossível esperar uma visualização detalhada da motilidade da célula espermática individual, mesmo quando realizada por um técnico treinado. O olho humano não é capaz disso! O CASA avalia mais de 400 células por amostra, aspeto que um técnico experimentado não consegue, analisando 2 a 3 campos microscópicos (Broekhuijsen et al. 2011).

No entanto, estas correlações positivas entre os dois tipos de avaliação foram encontradas em condições laboratoriais e, não significam, automaticamente, que um sistema CASA possa ser implementado num laboratório de avaliação de sémen (Broekhuijsen et al. 2011), pois que, apesar de se tratar de uma técnica de avaliação mais objetiva, ainda está sujeita a fatores que a influenciam, como a temperatura a que se realiza a análise, o diluidor utilizado, a concentração espermática da amostra, o número de campos avaliados e a iluminação (Verstegen et al. 2002). Os sistemas CASA requerem uma uniformização e uma validação antes de serem utilizados e as definições das imagens devem ser *standard* (Partyka et al. 2012), o que também depende da experiência do técnico responsável.

9.3.5. Variabilidade individual

Como foi referido anteriormente, considerou-se, para efeitos deste estudo, que bodes de alto nível de congelabilidade apresentaram ejaculados com uma motilidade pós-descongelação (subjetiva) superior a 30% e com uma covariância entre os ejaculados inferior a 0,1. Desta forma, apenas foram considerados indivíduos com sémen de alta congelabilidade, os bodes 2121 e 2808.

O presente trabalho revelou que os ejaculados desses bodes resistiram à congelação e à descongelação, demonstrando valores adequados nos parâmetros avaliados pela CASA, pelos testes complementares e restantes parâmetros avaliados. No entanto, não foram identificadas diferenças significativas entre esses indivíduos e os restantes, excetuando nas variáveis já mencionadas (a vitalidade, o TTR aos 5 minutos e a BCF).

É importante referir que os restantes indivíduos apresentaram, no geral, resultados médios com valores elevados do desvio padrão, indicando que os ejaculados que produziram eram altamente variáveis entre si, o que constitui uma característica pouco valiosa em programas de recolha e criopreservação de sémen, uma vez que um mesmo indivíduo pode produzir, sémen de alta e de baixa qualidade.

Tornam-se necessários mais estudos para determinar se se trata de uma característica dos bodes desta raça ou se será uma consequência direta da aplicação de protocolos de criopreservação universais, multi-espécie, que poderão prejudicar a qualidade do seu sémen.

Na indústria pecuária, são reconhecidos indivíduos chamados 'good freezers' e 'bad freezers', cujo sémen tem boa ou má congelabilidade, respetivamente, em que as doses de IA dos bodes 'bad freezers' contêm mais espermatozoides por dose seminal de forma a otimizar a sua fertilidade (Thurston et al. 2002). Com o avanço das tecnologias de avaliação do sémen, principalmente quanto às características e funções dos espermatozoides individuais num ejaculado, tornou-se claro que existe uma heterogeneidade considerável, nomeadamente no número e proporção de subpopulações morfologicamente distintas entre e dentro de ejaculados de mamíferos (Thurston et al. 2001). Estudos sobre esta matéria sugerem que existe uma forte relação entre a proporção de espermatozoides das diferentes subpopulações e a qualidade seminal, a fertilidade e a sua capacidade de resistir à criopreservação (Dorado, Molina et al. 2010). É possível que a qualidade do sémen pós-descongelação esteja mais relacionada com a constituição da população e subpopulações de espermatozoides dos ejaculados do que com outros parâmetros avaliados rotineiramente.

10. Conclusão

Apesar das tentativas de aperfeiçoar os protocolos de congelação e descongelação de sémen, existe ainda uma diminuição considerável na viabilidade espermática no sémen criopreservado. As amostras de sémen analisadas neste estudo apresentaram danos provocados pelo processo de criopreservação, demonstrado pela redução da motilidade e vitalidade espermáticas após a descongelação.

Neste estudo, foram realizados testes complementares e análises através do sistema CASA, para além da avaliação seminal rotineira, de modo a averiguar a extensão dos danos

criogénicos nos ejaculados com diferentes níveis de congelabilidade (qualidade seminal) e também para verificar a existência de variabilidade individual entre os machos.

O número de parâmetros seminais que sofreram alterações depois da descongelação foi menor nas amostras consideradas de alta congelabilidade, que demonstraram uma maior resistência ao processo de criopreservação. As diferenças encontradas sugerem que a identificação dos ejaculados em 'bons' e 'maus', baseando-se nos parâmetros seminais em fresco e pós-descongelação, é um bom indicador da congelabilidade do sémen de bode, tal como sugerido por outros autores.

Neste estudo, o efeito da criopreservação não foi igual para todos os indivíduos, nem para todos os ejaculados. No entanto, tendo em consideração a amostra analisada, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas que suportem a existência de variabilidade individual na criopreservação do sémen dos 7 bodes de raça Serpentina, uma vez que as diferenças significativas se cingiram à vitalidade, ao TTR (5 minutos) e ao BCF (CASA). É possível, que as diferenças observadas entre indivíduos tenham origem, não só nas suas características intrínsecas, mas também na aplicação de protocolos desenhados para várias espécies, que não tenham em consideração a variabilidade individual na tolerância dos espermatozoides aos crioprotetores e ao processo de criopreservação. No entanto, a análise do sémen por bode mostrou diferenças, ainda que não significativas, que indicam que alguns indivíduos desta raça produzem sémen que apresenta consistentemente boa qualidade seminal pós-descongelação, como foi o caso dos bodes 2121 e 2808.

Dos testes complementares realizados, apenas o TTR mostrou diferenças significativas entre ejaculados e entre indivíduos. Estes testes parecem ser adequados para uma avaliação adicional à avaliação rotineira do sémen, uma vez que têm a capacidade de avaliar características seminais mais específicas e, por isso, podem avaliar o potencial fértil das amostras de sémen criopreservado. Para além disso, podem ser uma ferramenta útil na seleção de reprodutores e na reformulação de protocolos de criopreservação.

O sistema CASA mostrou ser uma ferramenta valiosa na análise objetiva do movimento dos espermatozoides. No entanto, a utilização deste sistema tem de prever uma uniformização dos pré-requisitos, definição de parâmetros e treino dos técnicos de laboratório, de modo a garantir que os resultados são precisos e fidedignos. Sistemas deste género são uma mais-valia na avaliação seminal de raças em vias de extinção, uma vez que permitem um estudo mais aprofundado das características seminais, permitindo assim seleccionar os melhores reprodutores e também assistir na alteração de protocolos de criopreservação.

No presente estudo, a avaliação subjetiva do sémen apresentou uma correlação com a avaliação objetiva, o que demonstra que, apesar de menos precisa, a avaliação do sémen através da microscopia ótica tem um valor considerável. A estimativa visual da percentagem de células móveis é mais básica do que a do sistema CASA, que analisa as células

individualmente quanto ao seu padrão de movimento. Mesmo quando realizada por um técnico experiente, a avaliação subjetiva não é tão detalhada como a avaliação através de um sistema computadorizado. Neste estudo, as correlações encontradas entre a motilidade pós-descongelção subjetiva e os parâmetros do CASA demonstram uma relação relevante entre as avaliações subjetiva e objetiva. No entanto, a ausência de correlação entre as avaliações subjetivas do sémen fresco e pós-descongelção pode dever-se ao facto das avaliações em fresco e pós-descongelção terem sido realizadas por técnicos diferentes.

As avaliações em fresco, referidas neste estudo, teriam um maior potencial de comparação com as do sémen descongelado se tivessem sido realizadas avaliações mais profundas, através de testes complementares e do sistema CASA. No entanto, o desenho experimental deste ensaio revelou o modo como o sémen de 7 bodes de raça Serpentina reagia à congelação e descongelção, não só no que diz respeito à motilidade espermática, mas também em relação à integridade das membranas plasmáticas, à vitalidade, à morfologia e resistência dos espermatozoides.

Por último, deve enfatizar-se que teria sido conveniente ter havido a possibilidade de realizar uma avaliação dos parâmetros anteriormente referidos, nas amostras do sémen fresco e pós-descongelção, para um estudo comparativo mais abrangente.

11. Referências bibliográficas

- Arruda RP, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaime JD. 2011. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Rev Bras Reprod Anim.* 35(2):145-151.
- Ahmad M, Nasrullah R, Riaz H, Sattar A, Ahmad N. 2014. Changes in motility, morphology, plasma membrane and acrosome integrity during stages of cryopreservation of buck sperm. *J S Afr Vet Assoc.* 85(1):1-4.
- APCRS [internet]. 2008. [accessed 2020 Nov 3]. <http://www.cabraserpentina.pt/>.
- Apu AS, Khandoker MAMY, Husain SS, Fakruzzaman M, Notter DR. 2012. A comparative study of fresh and frozen-thawed semen quality in relation to fertility of Black Bengal goats. *IJAS.* 2(2):157-161.
- Bailey J, Morrier A, Cormier N. 2003. Semen cryopreservation: successes and persistent problems in farm species. *Can J Anim Sci.* 83(3):393-401.
- Barbas JP, Marques CC, Baptista MC, Vasques MI, Pereira RM, Cavaco-Gonçalves S, Mascarenhas RM, Poulin N, Cognie Y, Horta AEM. 2006. Reproduction in the goat Serrana breed: seasonal and individual factors affecting fresh and frozen semen performance, in vivo and in vitro fertility. In: *Animal Products from the Mediterranean Area.* Netherlands: Wageningen Academic Publishers. p. 337-342.
- Barbas JP, Mascarenhas RD. 2009. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank.* 10(1):49-62.
- Barbas JP, Leahy T, Horta AE, García-Herreros M. 2018. Sperm kinematics and subpopulational responses during the cryopreservation process in caprine ejaculates. *Cryobiology.* 82:137-147.
- Barros MHC, Shiomi HH, Amorim LS, Siqueira JB, Pinho RO, Lima DMA, Lopes PS, Guimarães SEF, Guimarães JD. 2013. Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste de termorresistência. *Acta Vet Bras.* 7(2):164 – 170.
- Bernardi ML. 2008. Tecnologias aplicadas ao exame do ejaculado suíno para a produção de doses de sêmen de alta qualidade. *Acta Sci Vet.* 36(1):5-16.
- Bezerra FSB. 2010. Conservação do sêmen caprino sob refrigeração ou congelação. *Acta Veterinaria Brasilica.* 4:520-525.
- Blässe AK, Oldenhof H, Ekhlasi-Hundrieser M, Wolkers WF, Sieme H, Bollwein H. 2012. Osmotic tolerance and intracellular ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. *Theriogenology.* 78(6):1312-1320.
- Broekhuijsen MLWJ, Šoštarić E, Feitsma H, Gadella BM. 2011. Additional value of computer assisted semen analysis (CASA) compared to conventional motility assessments in pig artificial insemination. *Theriogenology.* 76(8):1473-1486.
- Bruno de Sousa C. 2006. *Diversidade Genética de Populações Caprinas Portuguesas e relações genéticas com outros Caprinos Ibéricos e das Ilhas Canárias.* [Dissertação de Mestrado]. Lisboa: ISA e FMV - Universidade Técnica de Lisboa.

Carolino N, Bruno de Sousa C, Carolino I, Santos-Silva F, Sousa CO, Vicente A, Ginja C, Gama LT. 2016. Biodiversidade caprina em Portugal. In: Bayona JEV, Martínez LZ, Bermejo JVD, Galván GR, editors. Biodiversidad caprina iberoamericana. Bogotá (CO): Ediciones Universidad Cooperativa de Colombia. p. 57-74.

Casas I, Sancho S, Briz M, Pinart E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. 2009. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*. 72(7):930-948.

Castelo TS, Frota TR, Silva AR. 2008. Considerações sobre a criopreservação de sêmen de caprinos. *Acta Vet Bras*. 2(3):67-75.

Chelucci S, Pasciu V, Succu S, Addis D, Leoni GG, Manca ME, Naitana S, Berlinguer F. 2015. Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potencial during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*. 83(6):1064-1074.

Contria A, Valorz C, Faustinic M, Wegherb L, Carluccio A. 2010. Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*. 74(3):424-435.

Cunha ER, Silva CG, Martins CF. 2012. Estudo comparativo dos testes de termo-resistência rápido, lento e fisiológico em sêmen criopreservado bovino importado. In: Anais da 49ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia; 23-26 de julho de 2012; Brasília.

Curry MR. 2000. Cryopreservation of semen from domestic livestock. *Rev Reprod*. 5(1):46-52.

Daramola JO, Adekunle EO, Oke OE, Onagbesan OM, Oyewusi IK, Oyewusi JA. 2016. Effects of coconut (*Cocos nucifera*) water with or without egg-yolk on viability of cryopreserved buck spermatozoa. *Anim Reprod*. 13(2):57-62.

Dorado J, Hidalgo M, Muñoz A, Rodríguez I. 2009. Assessment of goat semen freezability according to the spermatozoa characteristics from fresh and frozen samples. *Anim Reprod Sci*. 112(1-2):150-157.

Dorado J, Molina I, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*. 74(5):795-804.

Dorado J, Muñoz-Serrano A, Hidalgo M. 2010. The effect of cryopreservation on goat semen characteristics related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci*. 121(1-2):115-23.

Evans G, Maxell WMC. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sidney (AU): Butterworths.

Fialho JBR. 1995. A Cabra Serpentina - Origem, Efectivos, Registo Zootécnico, Características Genéticas, Morfológicas e Produtivas. *Colectânea SPOC*. 6:27.

Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveira RFM. 2005. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod*. 2(2):139-144.

- Fonseca P, Fernandes L, Minhoto M, Cachatra A, Carreira P, Saraiva V. 2018. A produção de caprinos de raça serpentina: análise das explorações e dos produtores. AICA. 11:19-29.
- Frandsen RD, Wilke WL, Fails AD. 2009. Anatomy and Physiology of Farm Animals. In: Anatomy and Physiology of Farm Animals. 7th ed. [place unknown]: Wiley-Blackwell. p. 413-419.
- Gallego V, Herranz-Jusdado JG, Rozenfeld C, Pérez L, Asturiano JF. 2018. Subjective and objective assessment of fish sperm motility: when the technique and technicians matter. Fish Physiol Biochem. 44(6):1457-1467.
- Gangwar C, Kharche SD, Kumar S, Jindal SK. 2016. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. IJSR. 22(1):1-10.
- García-Vazquez FA, Gadea J, Matás C, Holt WV. 2016. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. Asian J Androl. 18(6):844-850.
- Gibbons A. 2002. [Artificial insemination with frozen semen in Angora goats]. Taurus. 16:24-32. Espanhol.
- Gillan L, Maxwell WMC, Evans G. 2004. Preservation of semen for artificial insemination. Reprod Fertil Dev. 16(4):447-454.
- Hidalgo M, Rodríguez I, Dorado JM. 2007. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. Anim Reprod Sci. 100(1-2):61-72.
- Holt WV. 2000. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. Theriogenology. 53(1):47-58.
- Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Zaneveld LJD. 1992. The hypoosmotic swelling test: an update. Arch Androl. 29(2):105-116.
- Jiménez-Rabadán P, Soler AJ, Ramón M, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Iniesta-Cuerda M, Fernández-Santos MR, Montoro V, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ. 2016. Influence of semen collection method on sperm cryoresistance in small ruminants. Anim Reprod Sci. 167:103-108.
- Kathiravan P, Kalatharan J, Karthikeya G, Rengarajan K, Kadirvel G. 2011. Objective sperm motion analysis to assess dairy bull fertility using computer-aided system – A review. Reprod Domest Anim. 46(1):165-172.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim Reprod Sci. 62(1-3):113-141.
- Lemma A. 2011. Effects of cryopreservation on sperm quality and fertility. In: Manafi M, editors. Artificial insemination in farm animals. 1st ed. Rijeka (HR): InTech; 191-216.
- Lima LF, Moura P, Passos PIB, Leal DR, Rumpf R, Neves JP. 2010. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. Ci Anim Bras. 11(4):835-844.

- Lodhi LA, Zubair M, Qureshi ZI, Ahmad I, Jamil H. 2008. Correlation between hypo-osmotic swelling test and various conventional semen evaluation parameters in fresh Nili-Ravi buffalo and Sahiwal cow bull semen. *Pak Vet J.* 28(4): 186-188.
- Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R. 2008. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim.* 32(4):225-232.
- Maxwell WMC, Watson PF. 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 42(1-4):55-65.
- Mcgowan M. 2019. Evaluation of the Fertility of Breeding Males. In: Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, editors. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th edition. [place unknown]: Elsevier. p. 619-634.
- Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better. *Theriogenology.* 57(1):327-344.
- Medrano A, Terrazas A, Soto R. 2010. Principles and perspectives for the conservation of goat buck spermatozoa. *Small Ruminant Res.* 89(2):140-143.
- Nur Z, Dogan I, Gunay U, Soylu MK. 2005. Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of Saanen goat bucks. *B Vet I Pulawy.* 49(2):183-187.
- O'Connell M, McClure N, Lewis SEM. 2002. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Hum Reprod.* 17(3):704-709.
- Oliveira IRSO, Alves HM, Castelo TS, Bezerra FSB, Bezerra ACDS, Silva AR. 2013. Correlações entre o teste hiposmótico e a avaliação clássica do sêmen de caprinos. *Ci Anim Bras.* 14(2):216-221.
- Partyka A, Niżański W, Ochota M. 2012. Methods of assessment of cryopreserved semen. In: *Current Frontiers in Cryobiology*. [place unknown]: InTech. p. 565-574.
- Penitente-Filho JM, Dias JCO, Oliveira FA, Silveira CO, Jimenez CR, Torres CAA. 2015. Correlation between sperm motility and hypoosmotic swelling test on cryopreserved goat semen. *Magistra.* 27(3/4):478-483.
- Peris-Frau P, Soler AJ, Iniesta-Cuerda M, Martín-Maestro A, Sánchez-Ajofrín I, Medina-Chávez DA, Fernández-Santos MR, García-Álvarez O, Maroto-Morales A, Montoro V, Garde JJ. 2020. Sperm cryodamage in ruminants: understanding the molecular changes induced by the cryopreservation process to optimize sperm quality. *Int J Mol Sci.* 21(8): 2781.
- Purdy PH. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Res.* 63(3):215-225.
- Reece WO. 2009. Male reproduction. In: *Functional Anatomy and Physiology of Domestic Animals*. 4th ed. Iowa (IA): Wiley-Blackwell. p. 432-457.
- Rodriguez-Martinez H, Barth AD. 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 64:39-54.
- Rodriguez-Martinez H. 2013. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. *Anim Reprod.* 10(3):148-159.

- Rodriguez-Martinez H. 2019. Semen evaluation: can we forecast fertility? *Vet Stanica*. 50(4):293-305.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995a. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*. 37(3–4):185-249.
- Salamon S, Maxwell WMC. 1995b. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*. 38 (1–2):1-36.
- Salamon S, Maxwell WMC. 2000. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*. 62(1-3):77-111.
- Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M. 2013. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Ruminant Res*. 112(1-3):123-127.
- Santos ADF, Torres CAA, Fonseca JF, Borges AM, Guimarães JD, Costa EP, Rovay H. 2006. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *R Bras Zootec*. 35(5):1934-1942.
- Schulze M, Henning H, Rüdiger K, Wallner U, Waberski D. 2013. Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology*. 80(9):990-998.
- Schulze M, Jakop U, Jung M, Cabezón F. 2019. Influences on thermo-resistance of boar spermatozoa. *Theriogenology*. 127:15-20.
- Sharma S, Sharma NK, Sinha NK, Sharma SS. 2013. Assessment of transaminases and effect of freezing rates on their leakage into seminal plasma of sirohi bucks. *Anim Vet Sci*. 1(2):18-22.
- Souza AF, Guerra MMP, Coletto ZF, Mota RA, Silva LBG, Leão AEDS, Sobrinho ESN. 2006. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 43(3):329-336.
- Sundararaman MN, Edwin MJ. 2008. Changes in motility characteristics of goat spermatozoa during glycerol-equilibration and the relevance to cryopreservation. *Asian J. Cell Biol*. 3(1):22-33.
- Talini R, Kozicki LE, Gaievski FR, Polo G, Lima LGF, Santiago J, Segui MS, Weiss RR, Galan TGB. 2019. Bovine semen thermoresistance tests and their correlation with pregnancy rates after fixed-time artificial insemination. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 71(6):1917-1925.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 1999. Sources of variation in the morphological characteristics of sperm subpopulations assessed objectively by a novel automated sperm morphology analysis system. *Reproduction (Cambridge, England)*. 117(2):271-280.
- Thurston LM, Watson PF, Holt WV. 2002. Semen cryopreservation: A genetic explanation for species and individual variation? *Cryo letters*. 23(4):255-262.

Thurston LM, Watson PF, Mileham AJ, Holt WV. 2001. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J Androl.* 22(3):382-394.

Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology.* 57(1):149-179.

Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr JA. 2009. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Anim Reprod Sci.* 113(1-4):279-282.

Vicent RF, Khoboso L, Tshimangadzo N. 2012. *Criopreservation of South African Indigneous goat semen: conservation of valuable genetic materials.* Saarbrücken (DE): LAP Lambert Academic Publishing GmbH & Co.

[WHO] World Health Organization. 2010. Standard procedures. In: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva (CH): World Health Organization. p. 7-114.

Yeste M. 2016. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 85(1):47-64.

Zee YP, Holt WV, Nicolson V, Pyne M, Johnston SD. 2009. Individual variability in post-thaw sperm survival in a captive koala population. *Cryobiology.* 59(1):69-74.

Zubair M, Lodhi LA, Ahmad E, Muhammad G. 2013. Hypo osmotic swelling test as screening for evaluation of semen of bull. *J Entomol Zool Stud.* 1(6):124-128.

Anexos

Anexo 1 Recolhas datadas avaliadas, por bode.

9964 <ul style="list-style-type: none">•23 out 2018•30 out 2018•8 nov 2018•12 nov 2018•14 nov 2018•5 dez 2018•9 set 2019 •7 ejaculados	2808 <ul style="list-style-type: none">•14 nov 2018•26 nov 2018•5 dez 2018•6 dez 2018•11 dez 2018•13 dez 2018•18 dez 2018 •7 ejaculados	2121 <ul style="list-style-type: none">•23 out 2018•30 out 2018•8 nov 2018 •3 ejaculados	2126 <ul style="list-style-type: none">•23 out 2018•30 out 2018•8 nov 2018•12 nov 2018•14 nov 2018•21 nov 2018 •6 ejaculados
0422 <ul style="list-style-type: none">•8 nov 2018•12 nov 2018•14 nov 2018•21 nov 2018•13 dez 2018•18 dez 2018 •6 ejaculados	0835 <ul style="list-style-type: none">•6 dez 2018•30 set 2019•24 set 2019 •3 ejaculados	6822 <ul style="list-style-type: none">•12 nov 2018•14 nov 2018•21 nov 2018•5 dez 2018•6 dez 2018•11 dez 2018•13 dez 2018•18 dez 2018 •8 ejaculados	

Anexo 2 - Ficha de avaliação e processamento de sémen



REPÚBLICA
PORTUGUESA

AGRICULTURA, FLORESTAS
E DESENVOLVIMENTO RURAL

MAR

Direção Regional de Agricultura e Pescas do Alentejo

CCS: PT4OC03 CS

CAS: 6.061-OC 6.061-B

Expl: WT5AA

ESPÉCIE					OBJECTIVO	
RAÇA	DATA ENTRADA NO CCS	SIA	LG		BPGA	
					IA	

Dados de Recolha

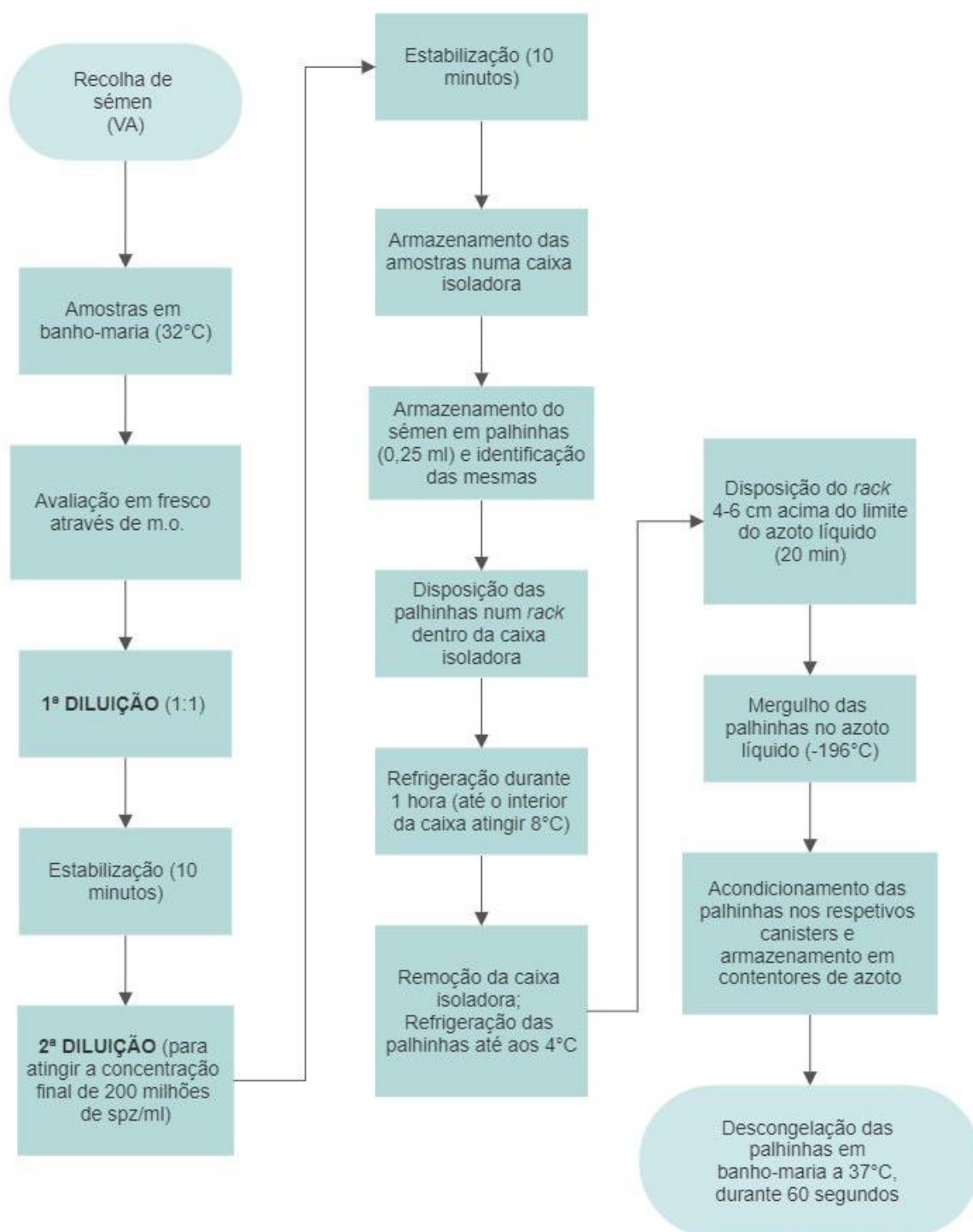
Vagina artificial ☐

Electro Ejaculação ☐

DATA						
Nº Ordem/Hora						
Volume (ml)						
Cor - Marfim/ leite/ leite magro/ translúcido						
Motilidade Massal (0 a 5)						
Motilidade individual progressiva (%)						
Aglutinação (0; +; ++; +++)****						
Concentração (x10 ⁹)						
Coloração vital (% spz.vivos)						
Morfologia (% formas Anormais)						
Protocolo de congelação						
Sémen apto para inseminação? (Sim/ Não)						
Sémen p/criopreservação						
Sémen p/utilização a fresco						
# Total espermatozoides p/ palhinha						
Nº palhinhas previstas						
Nº palhinhas realizadas						
Nº palhinhas armazenadas						
Cor palhinha						
Cor Tampão						
# Contentor / # Canister / # Andar / Cor do Globelet						
Hora início da refrigeração						
Hora da congelação						
Destino Sémen para IA (marca de exploração) e nº de doses						

Data, assinatura e carimbo do Médico Veterinário Responsável pelo CCS

Anexo 3 Protocolo de criopreservação de sémen



Anexo 4 Percentagem dos diferentes defeitos espermáticos avaliados na população amostral (n=40).

